INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Supplemento das Memorias
Nº. 8 22 de Junho de 1929

Summario:

**Aragão, Drs. H. de Beaurepaire, e Costa Lima, A. da.** Sobre a transmissão do virus da febre amarella pelas fezes de mosquitos infectados ..... 101
**Costa Lima, Dr. A. da.** Sobre dois scolytideos ..... 109
**Souza-Araujo, Dr. H. C. de.** Estudos sobre a Lepra. III. Transmissão da lepra humana ao camondongo branco ..... 113
**Souza-Araujo, Dr. H. C. de.** Studies upon Leprosy. I. Transmission of Human Leprosy to the white Mouse ..... 123
**Lutz, Dr. Adolpho.** Nova contribuição para o conhecimento do cyclo evolutivo das Holostomideas ou Strigeidas ..... 128

O supplemento das Memorias destina-se á publicação immediata das pesquizas realizadas no Instituto Oswaldo Cruz.

RIO DE JANEIRO
Typ. do INSTITUTO OSWALDO CRUZ
1929

# Sobre a transmissão do virus da febre amarella pelas fezes de mosquitos infectados [1]

Pelos Drs. H. de BEAUREPAIRE ARAGÃO e A. da COSTA LIMA.

Logo que surgiram os primeiros casos de febre amarella no Rio de Janeiro, occorreu-nos a ideia de averiguar qual o modo de contaminação dos individuos sujeitos ás picadas de mosquitos infectados, se exclusivamente pela saliva desses mosquitos, emittida no acto da picada, se pelas gotticulas do liquido, que sempre expellem pelo anus, quando se engorgitam de sangue.

Depois de algumas experiencias preliminares, que nos orientaram sobre a melhor technica a seguir, fizemos as que aqui descreveremos detalhadamente, pelas quaes fomos levados a concluir que as dejecções de mosquitos infectados, inoculadas por via subcutanea, são sufficientes para infectar o *Macacus rhesus*.

Os mosquitos que empregámos nas nossas experiencias (*Aëdes (Stegomyia) aegypti)*, obtidos de criações feitas no laboratorio, eram retirados das gaiolas communs e transportados para gaiolas de vidro de GODOY (Fig. 1).

Para infectal-os applicavamos estas gaiolas sobre a pelle de um macaco inoculado com o virus da febre amarella no primeiro dia de febre. Mantidos n'essas mesmas gaiolas até se tornarem infectantes, retiravamos, quando pretendiamos realisar qualquer experiencia, os necessarios exemplares, transportando-os para pequenos tubos de vidro (fig. 2) com uma das aberturas fechada com flanella e a outra com um tampão de algodão. A flanella tem a vantagem de ser atravessada com relativa facilidade pela proboscida do mosquito e impedir que qualquer gotticula de excreta a imbeba. Esses tubos, contendo, cada um, sómente um mosquito infectado, ficavam um ou dois dias em camara não muito humida e, para que promptamente picassem por occasião da experiencia, não se lhes dava alimento algum, durante esse tempo. Escolhiamos então dois *rhesus*, um para ser exclusivamente picado pelos mosquitos atravéz da flanella dos tubos e outro para ser inoculado com a diluição das fezes desses mesmos mosquitos. Logo que estes se engorgitavam de sangue no primeiro *rhesus*, afastavamos os tubos da pelle do macaco e os collocavamos horizontalmente sobre um supporte qualquer. Com o abdomen pejado de sangue os mosquitos pouco se movem e em alguns segundos pousam sobre a parede do tubo. A emissão de gotticulas de excreta, que se inicia, ás vezes, quando o insecto ainda está terminando a sucção do sangue, mais se evidencia quando os mosquitos repousam. Expellem então gotticulas que, não raro, formam uma gotta perfeitamente visivel a olho nu e que póde ser facilmente assignalada por uma pinta de tinta marcada na superficie externa

(1) Apresentado á Sociedade Brasileira de Biologia, em sessão de 29 de Maio de 1929.

do tubo. Retiravamos, em seguida, os mosquitos dos tubos, depois de anesthesial-os rapidamente com ether e colhiamos o material a ser inoculado. Para isto, tomavamos uma seringa com um pouco de agua esterilizada e, comprimindo o embolo, deixavamos cahir uma pequena quantidade deste liquido sobre os pontos em que se achavam as dejecções. Com a ponta da agulha faziamos a diluição, aspirando-a novamente para a seringa. A operação era repetida em todos os tubos, de modo a reunir na seringa material das dejecções de todos os mosquitos que haviam sugado o primeiro *rhesus*. Injectavamos então essa diluição, por via subcutanea, no outro *rhesus*, fazendo-se tambem algumas escarificações no tegumento do mesmo e sobre ellas vasando a mesma diluição.

Eis, em resumo, o observado nessas experiencias:

EXPERIENCIA 1—*M. rhesus* nº. 245. Temperatura inicial: 38º,8. Picado a 7 de Janeiro de 1929 por 5 mosquitos que haviam a 17 de Dezembro de 1928 sugado o *rhesus* infectado nº. 226, no periodo febril e, d'essa data em diante, alimentados a mel, como habitualmente fazemos com os mosquitos infectados.

Este macaco não apresentou reacção febril muito accentuada, sendo a maxima 39º,6 observada no 5º dia depois de ser picado. Desse dia em diante a temperatura declinou. No 8º dia apresentou-se á tarde com 37º,2 e cahido na gaiola. Foi, então, sacrificado. A autopsia e o exame histopathologico não revelaram lesão alguma de febre amarella.

EXPERIENCIA 2—*M. rhesus* nº. 246. Temperatura inicial: 38º,5. Inoculado tambem a 7 de Janeiro com diluição das fezes dos mosquitos que picaram o *rhesus* nº. 245.

No 3º dia depois da inoculação apresentou febre de 40º e no 4º dia 40º,1. Deste dia em diante a temperatura baixou, observando-se, entretanto, uma serie de pequenas oscillações. A 22, isto é, 15 dias depois de inoculado, novamente a temperatura ascendeu a 40º,5 oscillando, porem, nos 3 dias seguintes, entre 39º,6 e 39º,4. Finalmente a 26 a temperatura cahio a 36º,2 apresentando-se então o macaco muito enfraquecido.

Sacrificado nesse mesmo dia, verificámos que as visceras apresentavam o aspecto caracteristico observado nos casos de febre amarella. Entretanto, o exame histo-pathologico do figado não demonstrou a presença das lesões typicas da febre amarella.

EXPERIENCIA 3—*M. rhesus* nº. 400. Temperatura inicial: 38º,8. Picado a 30 de Abril por 6 mosquitos que haviam picado a 28 de Março o *rhesus* infectado nº. 369, no primeiro dia de febre.

A 5 de Maio, isto é, 5 dias depois de picado, apresentava, de manhã, 40º. No dia seguinte a temperatura baixou a 39º, para á tarde novamente se elevar a 40º,1. A 7—40º,2 de manhã e á tarde. A 8—38º,8 de manhã. A' tarde a temperatura cahio a 37º,8 sendo então sacrificado. O exame macroscopico das visceras e histo-pathologico do figado demonstraram a presença de lesões typicas da febre amarella.

EXPERIENCIA 4—*M. rhesus* nº. 401. Temperatura inicial: 39º,3. Inoculado a 30 de Abril com excreta dos mosquitos que sugaram o *rhesus* nº. 400.

Dois dias depois da inoculação a temperatura se elevou a 40º. Desse dia em diante oscillou entre 39º,7 e 39º,5.

A 8 foi sacrificado e autopsiado, não obstante apresentar a temperatura de 39º,5. Nessa occasião retirámos sangue do coração e inoculámos no *rhesus* 415, da experiencia seguinte.

As visceras apresentavam aspecto normal e o exame histo-pathologico foi tambem negativo.

EXPERIENCIA 5 – *M. rhesus* nº. 415. Temperatura inicial: 38º,8. Inoculado a 8 de Maio, por via intraperitoneal, com sangue retirado do coração do *rhesus* nº. 401.

A 13 apresentava 40º,5, mantendo-se a temperatura elevada, entre 40º,6 e 40º,3 no dia seguinte.

A 15 de manhã, apresentava 38º,5 e ás 19,40 horas, quando foi sacrificado, 36º,8.

Na autopsia notámos lesões macroscopicas typicas da febre amarella, confirmando-se tambem essa verificação pelo exame histo-pathologico do figado, que revelou a presença de inclusões acidophilas nucleares, necrose salpicada das cellulas hepaticas, degeneração e infiltração gordurosas e congestão.

EXPERIENCIA 6—*M. rhesus* nº. 417. Temperatura inicial: 38º,8. Picado a 10 de Maio por 5 mosquitos que sugaram a 1 de Abril o *rhesus* infectado nº. 373, no primeiro dia de febre.

A 15, á tarde, apresentava 39º,9. Nos dias seguintes a temperatura se manteve entre 40º e 40º,5. A 17 foi sangrado e o sangue inoculado no *rhesus* nº. 422. A 18 a temperatura ascendeu a 40º,8 para se manter nos dois dias seguintes em 39º. A 21, de manhã, apresentou 38º,5 e ás 18 1/2 horas— 35º,8. A 22 encontrámos o macaco morto na gaiola.

O figado, o baço e os rins apresentavam o aspecto macroscopico caracteristico observado nos casos de febre amarella. Havia tambem hemorrhagia no estomago.

O exame histo-pathologico revelou: numerosas inclusões acidophilas intranucleares, degeneração gordurosa moderada e necrose discreta das cellulas hepaticas.

EXPERIENCIA 7—*M. rhesus* nº. 418. Temperatura inicial: 39º,1. Inoculado a 10 de Maio com excreta de 4 dos mosquitos que picaram o nº. 417.

A 14, pela manhã, apresentava 40º, mantendo-se essa temperatura até o dia 16. Neste dia foi sangrado e o sangue inoculado no *rhesus* nº. 423. A 17 cahio a 39º,2 pela manhã e a 38º,7 á tarde. A 18 novamente subio a 40º,3 e a 19 a 41º,3, cahindo no dia seguinte a 37º,7, temperatura esta em que se manteve até á tarde. No dia seguinte (21) encontrámos o macaco morto na gaiola.

As visceras apresentavam lesões typicas da febre amarella, encontrando-se tambem grande parte do conteúdo estomacal denegrido. Essa verificação foi confirmada pelo exame histo-pathologico do figado, que revelou: inclusões acidophilas nucleares, necrose salpicada diminuta das cellulas hepaticas, degeneração e infiltração gordurosas e congestão.

EXPERIENCIA 8—*M. rhesus* nº. 422. Temperatura inicial: 39º,4. Inoculado a 17 de Maio, por via intraperitoneal, com sangue retirado do *rhesus* nº. 417.

A 20 apresentava, pela manhã, 40º,1 e á tarde 40º,7. A 21 baixou a 39º,6. A 22 a temperatura da manhã era de 33º, sendo então o animal sacrificado.

As visceras apresentavam lesões macroscopicas de febre amarella.

O exame histo-pathologico revelou: inclusões acidophilas intranucleares abundantes, extensa necrose das callulas hepaticas, degeneração gordurosa, congestão e infiltração por polymorphonucleares.

EXPERIENCIA 9—*M. rhesus* nº. 423. Temperatura inicial: 38º,9. Inoculado a 17 de Maio, por via intraperitoneal, com sangue retirado do *rhesus* nº. 418.

A maior elevação de temperatura observada neste macaco (40º,2) occorreu a 24 de Maio. A 25 a temperatura baixou consideravelmente e á tarde o animal foi encontrado morto na gaiola.

Apresentava pequenos fócos de peritonite, os orgãos congestos e o sangue invadido por um coccobacillo GRAM-negativo. O exame histo-pathologico revelou, como nos casos anteriores, inclusões acidophilas nucleares, necrose intensa das cellulas hepaticas, degeneração gordurosa e congestão.

---

Pelas experiencias realisadas podemos concluir que as dejecções dos mosquitos, experimentados quando já são infectantes pelas suas picadas, como estas, são tambem infectantes.

Assim como as picadas nem sempre determinam a morte de um *rhesus*, mesmo quando o faziamos picar por varios mosquitos infectados, assim tambem as fezes podem produzir uma infecção benigna ou mesmo grave, porem sem terminar pela morte do animal inoculado. Haja vista o occorrido com os macacos das experiencias 2 e 5.

Estamos convencidos que os macacos das experiencias 1 e 2, á vista dos resultados obtidos ulteriormente e não obstante ter sido negativo o exame histo-pathologico do figado de ambos, tambem contrahiram a infecção.

Pelas experiencias aqui apresentadas verifica-se que ha toda a vantagem em sempre se colher o sangue do macaco em observação logo que se manifeste uma elevação consideravel de temperatura, para inoculal-o em outro *rhesus* e assim obter uma confirmação de que aquelle realmente se infectou, mormente nos casos de se restabelecer da infecção ou de morrer tardiamente por qualquer outra causa (2).

Rio, 29—V—1929.

NOTA ADDICIONAL—Acabámos de verificar que a diluição de excreta de mosquitos infectados, quando deposta sobre a pelle ou na conjunctiva ocular, ambas sem solução de continuidade, tambem infecta o *M. rhesus*. Neste sentido fizemos algumas experiencias que serão descriptas num proximo artigo.

---

(2) Os exames histo-pathologicos foram feitos pelo Dr. MAGARINOS TORRES, a quem deixamos aqui consignados os nossos agradecimentos.

# On transmission of the virus of yellow fever by excreta of infected mosquitoes [1]

By Dr. H. de BEAUREPAIRE ARAGÃO and Dr. A. da COSTA LIMA.

As soon as appeared the first cases of yellow fever in Rio de Janeiro, it came to our mind to verify how the infection would result in individuals bitten by infected mosquitoes, whether exclusively by the secretion of the salivary glands of these insects, that passes along the proboscis when biting, or by the droplets of clear fluid which are always ejected through the anus, immediately after they withdraw the proboscis.

After some preliminary experiments, which have shown us the most efficient technique to be applied to, we undertook others, which we hereunder detailedly expose, and which lead us to the conclusion that dejections of infected mosquitoes, when inoculated subcutaneously, are sufficient to infect the *Macacus rhesus*.

The mosquitoes we used in these experiments (*Aëdes* (*Stegomyia*) *aegypti*) bred at the laboratory, were taken off from the common cages, transferred to glass containers of GODOY (fig. 1) and then kept supplied with honey.

In order to infect them, we applied the lower end of these containers to the skin of a monkey previously inoculated with the yellow fever virus, at the first day of fever. The infected mosquitoes were kept in these same containers until they had become infectant. Whenever we intended to perform some experiment, we removed the necessary specimens to small glass tubes (fig. 2), one of the openings of which was covered with a piece of flannel, the other one plugged with cotton-wool. The flannel shows the advantage of being rather easily passed through by the proboscis of the mosquito and not being soaked with any droplet of excreta. Each of these tubes containing a single infected mosquito, remained for one or two days in a rather not too moist chamber, and, during that time, in order to force them to bite readily on occasion of the experiment, they were not fed. We chose then two *rhesus*, one to be bitten by the mosquitoes exclusively through the pores of the flannel of the tubes; the other one to be inoculated with the dilution of excreta of the same mosquitoes. As soon as these had filled themselves with blood of the first *rhesus*, we removed the tubes from the skin of the monkey and placed them horizontally upon a stand of any kind. The mosquitoes, with their abdomen made heavy with the blood they have imbibed freely, almost do not move and after a few seconds lie on the wall of the tube. The excretion of droplets of fluid, which often begins while the insect is sucking blood, becomes more abundant when the mosquitoes are at rest. They then eject droplets, which, not seldom becoming confluent, form a small drop perfectly visible with bare

(1) Read before the Sociedade Brasileira de Biologia, May 29, 1929.

eye, and which may be easily marked with a point of ink outside the glass. We then removed the mosquitoes from the tubes, after having lightly etherized them, and gathered the material to be inoculated. For this purpose, we took a syringe containing a little sterilized water, and pressing on the piston, we allowed a small quantity of water to fall on the points where the dejections were sticking. With the tip of the needle, we made the dilution, and aspirated this again into the syringe. This operation was repeated with all the tubes, so as to gather into the syringe some material of the dejections of all mosquitoes which had bitten the first *rhesus*. We inoculated then this dilution, subcutaneously, into the other monkey, making also in its skin some scarifications on which we dropped a little of such material.

Here are summarized our observations :

EXPERIMENT 1—*M. rhesus* no. 245. Temperature at the outset 38o.8. Bitten on the 7th January 1929 by mosquitoes which, on the 17th December 1928 had fed on the infected *rhesus* no. 226, on the first day of fever. These mosquitoes have been, since that date, fed on honey, as we use to do with infected mosquitoes.

This animal did not show a very marked febrile reaction, the maximum having been 39o.6 on the 5th day after having been bitten. From this date, temperature went on decreasing. On the 8th day, at night, temperature had fallen to 37o.2 and the monkey was lying in the cage. He was then killed. Autopsy and histo-pathologic examination did not reveal any lesion of yellow fever

EXPERIMENT 2—*M. rhesus* no. 246. Temperature at the outset: 38o.5. Inoculated also on the 7th January, with a dilution of faeces of mosquitoes which had fed on *M. rhesus* no. 245.

On the third day after the inoculation, the fever had risen to 40o and on the 4th day, to 40o.1. Hence temperature sunk forthwith, a series of small fluctuations being observed in the meantime. On the 22nd, viz. 15 days after inoculation, temperature rose again to 40o.5 oscillating, however, during the three succeeding days, between 39o.6 and 39o.4. Finally, on the 26th, it had fallen to 36o.2 the monkey looking then very weak.

By killing it on the same day, we verified that the viscera showed the characteristic appearance observed in cases of yellow fever. Nevertheless, the histo-pathological examination of the liver did not reveal the presence of the typical lesions of yellow fever.

EXPERIMENT 3—*M. rhesus* no. 400. Initial temperature: 38o.8. Bitten on the 30th April by 6 mosquitoes which had fed on the infected *rhesus* no. 369, on the first day of fever.

On the 5th of May, say, five days after having been bitten, it showed in the morning 40o. On the following day, temperature had fallen to 39o, rising however again, in the evening, to 40o.1. On the 7th, in the morning 40o.2 and in the evening 40o.3. On the 8th: morning 38o.8. At night, temperature had fallen to 37o.8 being then the animal killed. Macroscopically, the viscera and histopathologically, the liver, showed the presence of the typical lesions of yellow fever.

EXPERIMENT 4—*M. rhesus* no. 401. Initial temperature: 39o.3. Inoculated on the 30th of April with excreta of mosquitoes that had bitten the *rhesus* no. 400.

Two days after the inoculation, temperature had risen to 40o. From then, it oscillated between 39o.7 and 39o.5.

Killed on the 8th and autopsied, though showing a temperature of 39o.5. At the same time, we extracted blood from the heart and inoculated it into *rhesus* no. 415 for the next experiment.

The viscera looked out with normal appearance and also the histo-pathological examination resulted negative.

EXPERIMENT 5—*M. rhesus* no. 415. Temperature at the beginning: 38o.8. Inoculated on the 8th May, intraperitoneally, with blood extracted from the heart of *rhesus* no. 401.

On the 13th attained 40o.5 and that high temperature was mantained, between 40o.6 and 40o.3 on the following day.

On the 15th, in the morning, it showed 38o.5 and at 19.40 o'clock, when killed, 36o.8.

Autopsy revealed typical lesions of yellow fever, this verification being later on confirmed after histo-pathological examen of the liver. There were acidophile nuclear inclusions, scattered necrosis of the liver cells, fatty degeneration, infiltration and congestion.

EXPERIMENT 6—*M. rhesus* no. 417. Initial temperature: 38o.8. Bitten on the 10th of May by 5 mosquitoes which had fed, on the 1st April, on the infected *rhesus* no. 373, on the first day of fever.

On the 15th, at night, temperature was 39o.9. By the following days, it kept between 40o and 40o.5. On the 17th, the monkey was bled, and the blood inoculated into the *rhesus* no. 422. On the 18th, temperature rose to 40o.8 and was maintained for the two subsequent days at 39o. On the 21st in the morning, it had sunk to 38o.5. On the 22nd on the morning, the monkey was found dead in its cage.

The liver, spleen, and kidneys showed macroscopically the characteristical appearance as observed in cases of yellow fever. There was also an hemorrhage in the stomach.

Histo-pathological examination of the liver revealed: numerous acidophile nuclear inclusions, fatty degeneration and slight necrosis of the liver cells.

EXPERIMENT 7—*M. rhesus* no. 418. Initial temperature: 39.o1. Inoculated on the 10th May with excreta of 4 mosquitoes which had bitten *rhesus* 417.

On the 14th in the morning, the fever had attained 40o, and maintained itself at this degree until the 16th. By that day, some blood was taken off and inoculated into *rhesus* 423. On the 17th, the temperature sunk to 39o.2 in the morning and 38o.7 at night. On the 18th, a new rise to 40o.3 and on the 19th, to 41o.3, falling the next day to 37o.7, until at night. On the 21st, the monkey was found dead in its cage.

The viscera showed typical lesions of yellow fever and the greatest part of the material contained in the stomach had turned black by altered blood. That verification was confirmed by the histo-pathological examination

of the liver, which revealed: acidophile nuclear inclusions, slight scattered necrosis of the liver cells, fatty degeneration, infiltration and congestion.

EXPERIMENT 8—*M. rhesus* nº. 422. Initial temperature: 39º.4. Inoculated on the 17th May intra-peritoneally, with blood taken from *rhesus* 417.

It showed on the 20th, in the morning, 40º.1 and at night, 40º.7. On the 11st, temperature sunk to 39º.6. On the 22nd, in the morning, 35º.6 and at night, 33º, being then the animal killed.

The viscera showed macroscopic lesions of yellow fever.

Histo-pathological examination revealed: acidophile nuclear inclusions, extensive necrosis of hepatic cells, fatty degeneration, congestion and infiltration by polymorphonucleated leucocytes.

EXPERIMENT 9—*M. rhesus* nº. 423. Initial temperature: 38º.9. Inoculated on the 17th May, intra-peritoneally, with blood taken from *rhesus* nº. 418.

The highest temperature observed in this monkey, 40º.2, was attained on the 24th May. On the 25th, it lowered considerably, and at night, the animal was found dead in its cage.

It showed small foci of peritonitis, congested organs, and its blood invaded by a GRAM-positive cocco-bacillus. The histo-pathological examination revealed, like the former cases, nuclear acidophile inclusions, an intensive necrosis of liver cells, fatty degeneration and congestion.

---

From all experiments carried on, we may draw the conclusion that the dejections of mosquitoes, whose bites are already infectant, are equally infectant.

The same as what happens with bites of infected mosquitoes, which not always cause the *rhesus* to die, even when this is bitten by several insects, faeces may produce mild or severe infection, although without fatal results, the animal recovering from the infection. We need only see what happened in the case of the monkeys of our experiments 2 and 5.

We feel convinced that the monkeys of the experiments 1 and 2, considering the results obtained later on, and though were negative the histo-pathological examination of the liver of both, had contracted the disease.

From the above mentioned experiments remains demonstrated that it will be advisable to gather some blood of the monkey in observation, as soon as it shows a serious rise in temperature, inoculating this blood into another *rhesus*, in order to obtain a confirmation that the former was really infected, specially in such cases when it recovers from the infection or dies afterwards in consequence of any other cause (2).

Rio de Janeiro, May 29, 1929.

ADDITIONAL NOTE—We have lately verified that the dilution of excreta of infected mosquitoes, when put in contact with the skin or with the ocular conjunctive, proved also infective to the *M. rhesus*. In this way we made a repeated trial that will be further described in a separate article.

---

(2) The histo-pathological examinations have been performed by Dr. MAGARINOS TORRES, to whom we should like to express our heartiest thanks.

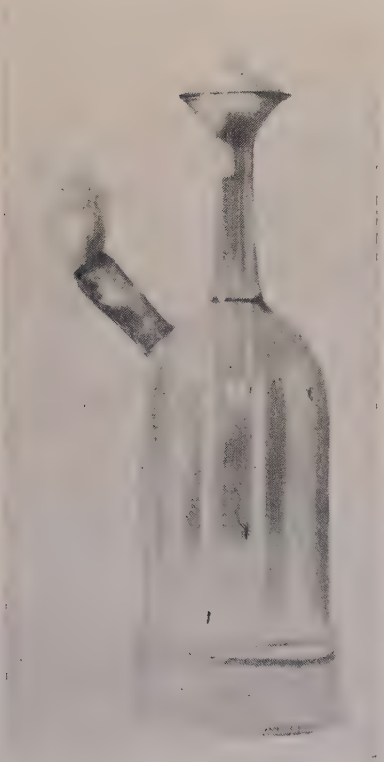


Fig. 1—Gaiola de vidro de GODOY.
Fig. 1—Glass container of GODOY.

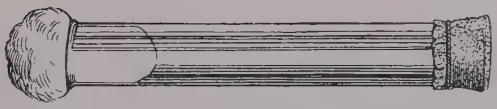


Fig. 2—Tubo de vidro usado nas nossas experiencias (metade do tamanho natural).
Fig. 2—Glass tube used in our experiments (half the natural size).

# Sobre dois scolytideos

Pelo Dr. A. da COSTA LIMA.

No presente artigo estudo duas especies de scolytideos, uma phleophaga, outra espermophaga, que vivem em plantas de nossa flora. A primeira foi recentemente descripta por EGGERS com o nome—*Hypocryphalus mangiferae*, e foi encontrada em galhos de mangueira (*Mangifera indica*), a segunda, ainda não descripta e pertencente a um genero que me parece novo, foi por mim designada *Spermophthorus apuleiae*, por se criar em sementes de páo ferro (*Apuleia ferrea*).

Ha tempos recebera material de ambas essas especies, porém, tive que adiar a publicação desta nota pelo motivo que exporei linhas a seguir.

Quando trabalhava no Instituto Biologico de Defesa Agricola, os meus auxiliares do Serviço de Vigilancia Sanitaria Vegetal, inspeccionando pomares do Districto Federal, tiveram o ensejo de observar mangueiras cujos galhos se apresentavam mais ou menos atacados pelo primeiro insecto.

Ulteriormente foram-me remettidos da Bahia, pelo Eng. Agr. ANTONIO DE AZEVEDO, galhos da mesma planta com identica infestação.

Ao vir para o Instituto Oswaldo Cruz, revendo todo esse material, pude verificar que o causador dos damnos observados era uma nova especie de *Hypochryphalus*.

Pouco tempo depois de ter chegado a esse resultado, soube que CARLOS MOREIRA recebera tambem material do mesmo scolytideo e que, tendo-o enviado a EGGERS para determinação, d'elle obtivera a informação de se tratar d'uma nova especie de *Hypocryphalus*, designando-a *H. mangiferae*.

N'essa informação EGGERS dizia pretender incluir a descripção do insecto n'um artigo sobre scolytideos sul-americanos, a ser publicado n'um periodico scientifico de S. Paulo.

Sciente disso, escrevi a EGGERS pedindo-lhe, caso lhe conviesse, mandar-me a diagnose da sua especie, afim de incluil-a integralmente, como sua portanto, na nota em que desejava estudar não só esse, como o outro insecto a que me referi no começo deste artigo. Não logrando obter desse especialista uma resposta, senti-me, comtudo, no dever de não divulgar essa nota emquanto não fosse dada a publicidade a diagnose do insecto, reconhecido por EGGERS como nova especie antes da minha verificação.

Tendo sido publicada recentemente tal diagnose (*), posso agora livremente tratar do insecto em questão.

---

(*) EGGERS, H. Ipidae (Coleoptera) da America do Sul. *Arch. Inst. Biol. Def. Agric. Anim.*, I, 1928, p. 85.

Eis a descripção de EGGERS:

"*Hypocryphalus mangiferae* n. sp.

Gedrungen, graubraun, fast matt infolge dichter Punktierung, mit langen Borsten; Flügeldecken einzeln abgerundet und verkürzt, sodass das siebte Tergit vollkommen unbedeckt ist, wie bei seinen indomalayischen Gattungsgenossen.

Kopf leicht gewölbt, über dem Munde leicht eingedrückt, fein und dicht punktiert.

Halsschild breiter als lang, von den leicht gerundeten Hinterecken an allmählich nach vorne abgerundet; seitlich und hinten nicht gerandet. Am Vorderrand in der Mitte vier kleine Höcker. Oben gewölbt, ohne Buckel, fein und dicht runzelig punktiert, das vordere Drittel mit einem locker gestellten Höckerfleck, seitlich und vorne einzeln lang behaart.

Schildchen deutlich, hinten gerundet.

Flügeldecken so breit und reichlich doppelt so lang wie Halsschild, hinten breit abgerundet und an der Naht eingezogen und verkürzt. Reihenpunkte undeutlich in flachen Streifen, Zwischenräume ganz flach gewölbt, äusserst dicht fein runzelig punktiert und mit länglichen, anliegenden Grunds chuppchen dich bedeckt, einreihig lang, steif behaart. Das letzte unbedeckte Tergit dicht punktiert.

Länge: 1.5 mm.

Fundort: Brasil, von C. MOREIRA an *Mangifera indica* gesammelt. Type Sammlung EGGERS".

Provavelmente o typo de EGGERS é um macho, pois as femeas tem 2 mm. de comprimento, ou pouco menos, emquanto que os machos excedem de 1,50 mm. Apresento aqui photomicrographias da antenna (fig. 4), do proventriculo (figs. 2 e 3) e da genitalia do macho desta especie (figs. 5 e 6). Junto tambem uma photographia de galhos infestados (fig. 1), pela qual se póde verificar que o insecto mina galerias irregulares, escavadas na camada cortical interna e no cambium.

O *H. mangiferae* ataca de preferencia as mudas, produzindo nestas damnos mais importantes que os observados nos galhos de plantas mais velhas.

O material que servio para os meus estudos encontra-se nos vidros ns. 218 e 219 e nas laminas 613, 615, 817-822 da collecção entomologica do Instituto Oswaldo Cruz.

---

O outro scolytideo, que aqui estudarei, ataca as favas de páo-ferro, realizando-se nas sementes o desenvolvimento do insecto.

O material que possuo foi colhido em Campos, Estado do Rio, a 26 de Agosto de 1927, pelo auxiliar do Serviço de Vigilancia Sanitaria Vegetal, JOÃO VALLIENGO JUNIOR.

Trata-se de uma especie, cujos principaes caracteres morphologicos externos, combinados com os da anatomia interna, indicam claramente que se a deve incluir nos ipineos da tribu *Pityophthori*. Nella o aspecto dos tarsos é tão singular, que me vi forçado a consideral-a como representante de um novo genero (*Spermophthorus*), evidentemente proximo do genero *Pityophthorus* EICHH. (fam. Ipidae, subfam. Ipinae).

## Spermophthorus n. g.

*Antennae funiculo 5 articulato, articulo 1º crassiusculo, bulbiformi, sequentibus transversis; capitulo sat magno, ovali, compresso, indistincte 4 articulato. Mentum cordatum, versus basin fortiter angustatum, lateribus rotundatum, cum ligula basi latitudine menti, antrorsum angustata, in basi menti inserta* (fig. 10). *Maxillarum mala intus spinulis compressis et rigidis armata. Tibiae extus parce spinulosae. Tarsi articulis 1, 2 subaequalibus brevissimis, fere connatis, in apice tibiae subreconditis; articulo 3 longissimo. Scutellum distinctum. Elytris postice utrinque juxta-suturam sulcatis. Pygidium in parte abdominis inferiore conspicuum.*

*Generis species unica—apuleiae n. sp.*

### S. apuleiae n. sp. (figs. 7—18)

*Long. 1,75-2,3 mm.*

*Subelongatus, cylindricus, ferrugineo-testaceus vel nigricans. Prothorace antice concentrice exasperato, postice fortiter punctato, setis squamulaeformibus adsperso. Elytris lineato-punctatis, declivitate utrinque fortiter sulcata, interstitiis subtilissime punctulatis, squamulis flavo-auratis seriatim ornatis.*

*Mas.: fronte plus minusve profunde excavata.*

*Fem.: fronte convexiuscula, medio-carinata.*

Nesta especie o tamanho dos machos, em geral, excede o das femeas. De facto, os maiores especimens da serie examinada são machos; as femeas, ou são bem menores que estes, ou tem o porte dos machos menos robustos. Aliás, esta peculiaridade interessante tambem se observa em algumas especies do genero *Pityophthorus*.

A coloração dos exemplares varia consideravelmente, provavelmente em relação com o gráo de maturidade dos mesmos. Todavia os machos, em geral, são bem mais escuros que os especimens do outro sexo.

As antennas (figs. 12 e 18) apresentam uma clava de aspecto caracteristico. As suturas são obsoletas no meio; nos bordos lateraes, porém, ha 2 manchas escleraes, visiveis em ambas as faces, contrastando fórtemente com a coloração amarellada do resto da clava.

Os elytros são distinctamente ponteados em series longitudinaes e parallelas e, nos intersticios, apresentam um pontilhado finissimo. Nos pontos seriados, inserem-se, alternadamente, uma serie de escamas, do typo representado na fig. 9, e uma outra de pelos mais curtos que aquellas. As 2 series mais externas de pontos piliferos, do meio do elytro até o sulco juxta-sutural, formam estrias, sendo mais profunda a que corre parallelamente a margem lateral do elytro.

Os urosternitos 2 e 4 são fundidos, notando-se, entretanto, a sutura que os separa. O bordo posterior do 7º é cortado circularmente, de modo a incluir a porção reflectida do pygidio, que é, assim, perfeitamente visivel na face ventral do abdomen. O aspecto dos tarsos (figs. 13, 14 e 15) é que se me afigura bem caracteristico e sufficiente para crear para esta especie um novo genero, distincto de *Pityophthorus*. De facto, neste ultimo

genero, os articulos 1, 2 e 3 são approximadamente iguaes (fig. 13, lado esquerdo). Em *Spermophthorus* os 2 primeiros articulos, sendo muito pequenos e quasi fundidos, ficam occultos sob o apice da tibia; o 3º articulo é relativamente muito grande e espesso. Pelos demais caracteres, evidentemente a especie muito se approxima de *Pityophthorus*, verificando-se que essa affinidade tambem se accentua pelo estudo da anatomia interna do insecto. O proventriculo (figs- 16 e 17) e a genitalia do macho (fig. 8) exhibem estructuras de aspecto semelhante ao que se observa n'esses mesmos orgãos em especies do genero *Pityophthorus*.

O material typico é representado por varios especimens de ambos os sexos conservados nos vidros 216 e 217 e nas laminas 616-623 e 638-845 da collecção entomologica do Instituto Oswaldo Cruz.

Os desenhos foram feitos a camara clara pelo autor e as photomicrographias pelo Sr. J. PINTO.

Manguinhos, 28 de Maio de 1929.

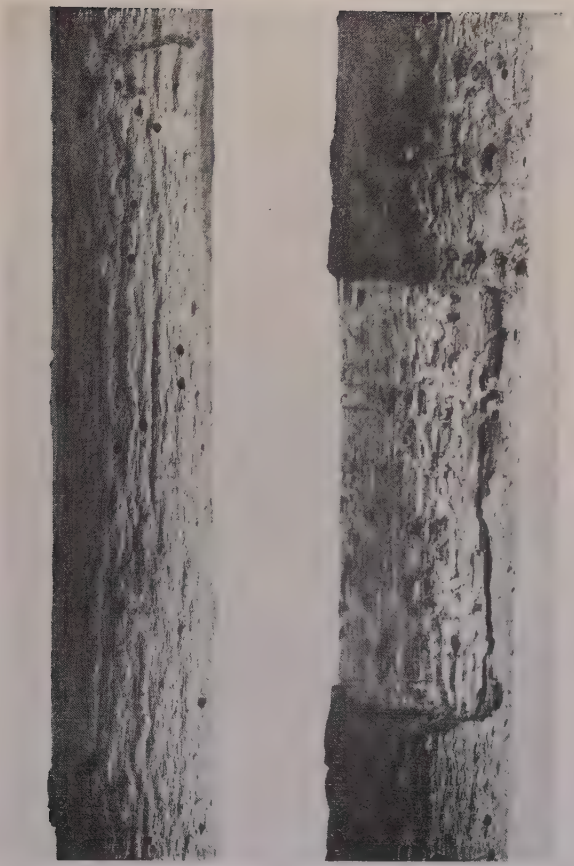


Fig. 1—Galhos de mangueira infestados pelo *Hypocryphalus mangiferae* (um pouco augmentado).

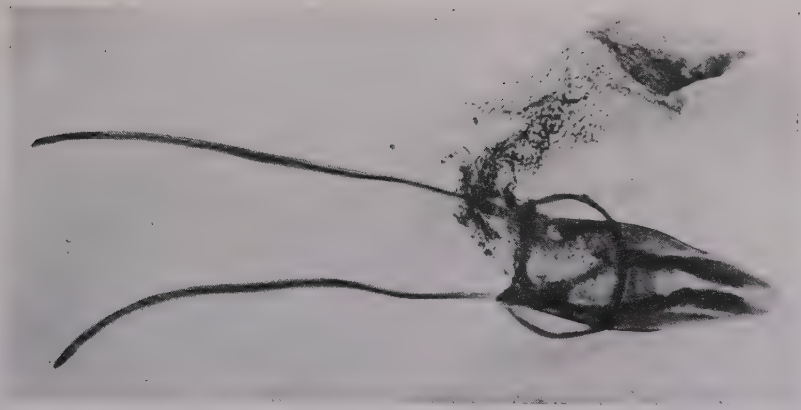
2

3

4

Fig. 2—Parte interna do proventriculo de *H. mangiferae* ( × 260).
Fig. 3—Proventriculo de *H. mangiferae*, depois de aberto e estendido ( × 100).
Fig. 4—Antenna de *H. mangiferae* ( × 180).

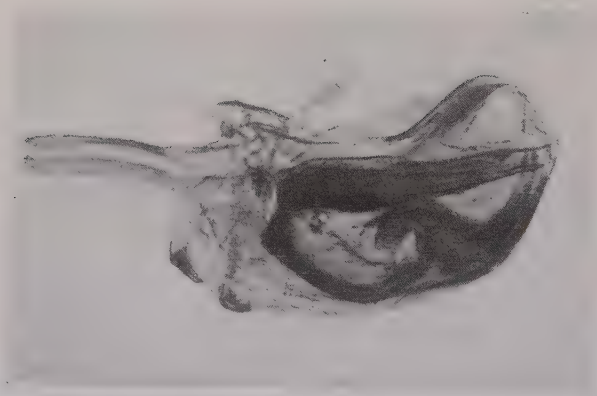
5



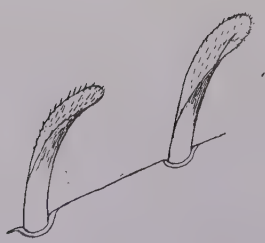
6

Figs. 5 e 6—Genitalia do ♂ de *H. mangiferae* ( × 120).

7

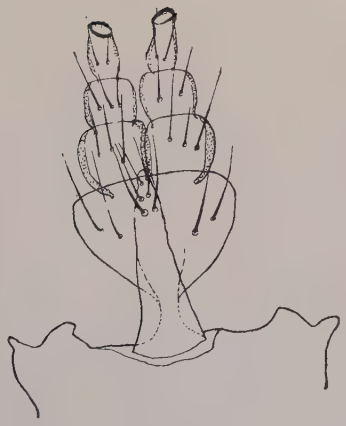


8



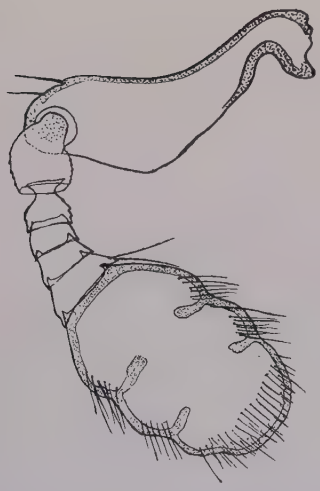
9

Fig. 7—*Spermophthorus apuleiae.* Os dois exemplares da direita são femeas ( × 11).
Fig. 8—Genitalia do ♂ de *S. apuleiae* ( × 180).
Fig. 9—Escamas dos elytros de *S. apuleiae.*

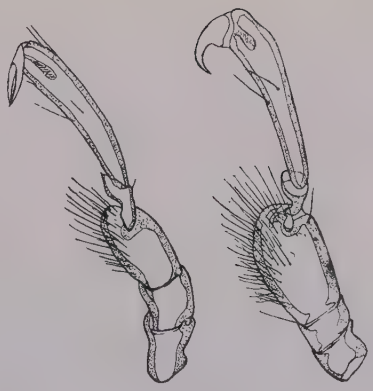


10

11



12



13

Fig. 10—Labium de *Spermophthorus apuleiae*.
Fig. 11—Mandibula de *S. apuleiae*.
Fig. 12—Antenna de *S. apuleiae*.
Fig. 13—Tarsos de *Pityophthorus xylotrupes* (esquerda) e de *Spermophtorus apuleiae* (direita).

14

15

Fig. 14—Perna anterior de *Spermophthorus apuleiae* ( × 100).
Fig. 14—Perna posterior de *Spermophthorus apuleiae* ( × 100).

16

17

18

Fig. 16—Parte interna do proventriculo de *Spermophthorus apuleiae* ( × 260).
Fig. 17—Proventriculo de *S. apuleiae*, depois de aberto e estendido ( × 100).
Fig. 18—Antenna de *S apuleiae* ( × 180).

# Estudos sobre a Lepra

## III. Transmissão da lepra humana ao camondongo branco (*)

(2a Nota com 6 figuras)

Pelo Dr. H. C. de SOUZA-ARAUJO.

Tenho a honra de apresentar á Academia a minha segunda nota sobre a lepra experimental. Ella é o resumo dos protocollos das inoculações de 33 camondongos brancos, com material leproso virulento. Serão objecto de outra nota os resultados das inoculações de camondongos com material leproso avirulento, assim como as inoculações de outros animaes de laboratorio, menos sensiveis á infecção.

*Technica.* Os lepromas, extirpados sem pelle, são triturados em grál esterilizado, com areia e sôro physiologico. A emulsão obtida é diluida no mesmo sôro, até uma concentração conveniente, verificada ao microscopio, filtrada em algodão e inoculada o mais cedo possivel. A via preferida foi a intraperitoneal e a dose para cada camondongo de 1/2 c.c., podendo ser repetida a inoculação com o intervallo de duas a trez semanas.

*Protocollos.* Os trez camondongos referidos na 1a. nota (2-8-928) pertenciam aos lotes 3, 4 e 5.

Do *lote 4* constam 9 camondongos inoculados, em 3-7-928, com material de ANDRADE. Subtrahido o No. 2 da 1a. nota ficaram 8. Destes, 4 foram reinoculado em 26-7, com egual dose de material do mesmo doente.

A sorte dos 4 camondongos primitivos foi a seguinte: 1 morreu a 9-8, (com 37 dias de inoculado), apresentando *micro-abcessos nos pulmões*, ricos em bacillos acido-alcool-resistentes e *ganglios mesentericos caseificados*, com raros bacillos. Os esfregaços do figado, dos rins e do baço foram negativos.

Outro morreu a 21-8 (49 dias) apresentando apenas raros bacillos no rim e uma globia no liquido peritoneal.

O 3o, sacrificado quando agonizava, em 26-9 (53 dias), apresentava *nodulos brancos*, como grãos de areia ou semelhantes ás granulações de mycetoma, adherentes ao mesenterio, ao epiploon e ás visceras abdominaes, resistentes ao esmagamento e formados de massas de bacillos acido-alcool-resistentes e raros detrictos cellulares.

O 4o, sacrificado e necropsiado em 15-12 (165 dias), apresentava *3 micro-abcessos* no figado, identicos aos do 3o. camondongo da nota prévia, *2 nodulos brancos* eguaes aos descriptos acima, entre o pancreas e o baço e 1 terceiro adherente ao epiploon.

---

(*) Trabalho lido na Academia Nacional de Medicina, em 31—5—929.

Esfregaços desses nodulos revelaram *massas de bacillos* acido-alcool-resistentes. Os esfregaços do figado, do rim e do pulmão, foram negativos.

Parecendo-me de grande interesse a presença de taes nodulos desejei que os collegas do Instituto de Manguinhos os vissem *in loco* e assim a meu convite estiveram no meu laboratorio os Drs. CHAGAS, GODOY, FÁRIA, FONSECA e outros. D'ahi em deante o Dr. LUTZ começou a se interessar pelas minhas experiencias e os seus conselhos me teem sido de grande valia.

Dos 4 camondongos reinoculados, 1 morreu 114 dias após a inoculação (25-10), não apresentando lesões nem bacillos.

Outro, morto em 5-12 (154 dias), apezar de não apresentar lesões macroscopicas, tinha grande abundancia de bacillos em feixes e globias, nos esfregaços das visceras.

O 3º, sacrificado no mesmo dia 5-12, apresentava *nodulos minusculos* no figado, entre os lobos quadrado e o de SPIEGEL, *1 nodulo maior* (pequeno tumor) adherente ao lobo direito (V. photos 2 e 3) e outros de tamanhos varios adherentes ás dobras mesentericas e ao epiploon. Córtes desse figado revelaram granulomas de origem peripherica.

Os córtes do tumor mostram focos de necrose com espaços deixados por crystaes de cholesterina.

Um dos nodulos maiores, do figado, cortado e esmagado sobre lamina, parecia um kysto cheio de massas bacillares, especies de *globias gigantes*, nunca vistas em material humano ou experimental.

O 4º, sacrificado e necropsiado em 15-12 (164 dias), apresentava tambem taes *granulos* no figado, debaixo do lobo quadrado. Os esfregaços das visceras abdominaes destes dous ultimos animaes, a um exame microscopico rapido, não revelaram bacillos acido-alcool-resistentes.

Estes bellos resultados mostram a conveniencia das reinoculações, assumpto muito discutido na 3ª Conferencia Internacional da Lepra (Rapport, 1924, p. 117).

Do *lote 5* constam 6 camondongos inoculados, em 5-7-928, com material de HILDA, 1 dos quaes figura sob o nº. 3, na Nota prévia. O 2º, morto em 12-8 (38 dias) e o 3º, em 19-9 (76 dias), apresentavam *bacillos acido-alcool-resistentes* em esfregaços dos principaes orgãos abdominaes e tambem nos ganglios mesentericos do ultimo.

O 4º, sacrificado agonizante e necropsiado em 9-10 (97 dias), apresentava *pequeno tumor* entre o figado e o pancreas, e *micro-abcessos* no baço. Os esfregaços desse tumor, do figado, do baço e do pulmão eram ricos em bacillos acido-alcool-resistentes.

O 5º, morto em 24-11 (172 dias) apresentava *pequeno tumor no pancreas* (V. photo 4) e *8 minusculos nodulos* adherentes ás alças mesentericas e ao epiploon.

A semeadura desses nodulos em agar-manteiga deu resultado negativo.

O 6º, sacrificado e necropsiado em 23-1-929 (com 202 dias de inoculado), apresentava pontos de *necrose* no figado, *nodulos brancos* adherentes á capsula dessa glandula, e outros espalhados na cavidade abdominal. Esses nodulos foram pescados, triturados em geral e a emulsão inoculada em 2 camondongos. O resultado foi negativo.

O tumor do pancreas, acima referido, foi examinado e descripto pelo Dr. MAGARINOS TORRES, que o achou muito interessante pela presença de espaços deixados por crystaes de cholesterina. O Dr. AMADEU FIALHO, consultado tambem sobre isso, é de opinião que esse achado é uma curiosidade histopathologica.

Os 6 camondongos do *lote 7* foram inoculados em 26-7-928 com material de ANDRADE. Um delles morreu no 1º. mez e não foi examinado; outro morreu em 15-11 (112 dias) apresentando *1 nodulo* no figado, com grandes massas de bacillos acido-alcool-resistentes, e no baço zonas de necrose, com raros bacillos.

Os 4 restantes foram sacrificados e necropsiados em 15-11 (142 dias) apparentando estado normal. 3 delles tinham *nodulos* em tudo eguaes aos já descriptos.

Todos os esfregaços das visceras abdominaes foram negativos.

Os *3 camondongos* do *lote 13* foram inoculados em 23-10-928, com material de F. LOPES. Como a emulsão era pouco concentrada augmentei a dose para 1 c.c., para a injecção intraperitoneal e 1/4 c.c. dado foi por via subcutanea.

Para uma demonstração ao Dr. BORZONE, director do Instituto Bacteriologico de Santa Fé, Argentina, sacrifiquei esses 3 animaes em 24-1-929 (com 92 dias).

O 1º. autopsiado apresentava *innumeros granulos* espalhados e adherentes ao mesenterio, ao epiploon e ao figado.

Esta glandula apresentava *micro-abcessos* generalizados.

Os esfregaços dos granulos, do figado e do baço revelaram uma formidavel abundancia de bacillos acido-alcool-resistentes em feixes, em globias typicas e em massas. O Dr. BORZONE levou todo o material deste camondongo para estudar na Argentina.

O 2º. autopsiado apresentava: alguns *nodulos*, *1 tumor* adherente ao baço e á parede abdominal, 1 *abcesso* no lobo esquerdo do figado e *innumeros pequenos nodulos* debaixo deste orgão, adherente ás dobras do mesenterio, e outros espalhados sobre os intestinos, etc.

Tanto os esfregaços como os córtes desse tumor são ricos em bacillos da lepra.

O 3º. e ultimo apresentava tambem *granulos*, em menor numero, espalhados pela cavidade abdominal. Os esfregaços dos granulos, do baço e do figado foram positivos.

Os 6 camondongos do *lote 14* foram inoculados, em 27-11-928, com 1 c.c. de material de A. PARIS. 2 delles morreram a 1 e 4-12 e não foram examinados. Outros 2 morreram em 6-12 (9 dias) apresentando poucos bacillos acido-alcool-resistentes no baço de um, e no baço, rim, testiculo e liquido peritoneal do outro. Nenhum nodulo ou ganglio visivel a olho nú. O 5º, morto em 10-12 (13 dias), apresentava *1 ganglio mesenterico* bastante augmentado. Macroscopicamente as visceras pareciam normaes. Os esfregaços do ganglio, do baço, dos rins e do figado eram ricos em bacillos acido-alcool-resistentes, provavelmente producto de absorpção (?). Ausencia de nodulos.

O 6º. e ultimo, sacrificado em 25-1-929 (59 dias), apresentava raros *granulos parasitarios* e *1 ganglio mesenterico* tumefacto e com alguns bacillos acido-alcool-resistentes.

O *lote 17* consta de 5 camondongos inoculados, em 22-2-929, com emulsão fresca e filtrada de lepromas que extrahi de 5 doentes do Hospital de S. Sebastião. A dose foi de 1/2 c.c.

O 1º. delles morreu em 10-3-929 (16 dias) apresentando um pequeno *tumor* junto ao figado e adherente á musculatura da parede anterior do abdomen (V. photos 5 e 6), o figado descorado, 1 ganglio mesenterico e outro inguinal augmentados.

Os córtes do tumor são muito ricos em bacillos acido-alcool-resistentes, intra e extracellulares. Os esfregaços do figado, do rim, do pulmão e de um ganglio inguinal foram positivos. Os do baço foram negativos. Córtes seriados provaram que esse tumor interessava tambem o figado.

O 2º. foi sacrificado em 15-5 (52 dias) por apresentar vasta ulceração crostosa nas ancas. Apresentava *nodulos abdominaes* e bacillos nas visceras.

Os 3 ultimos camondongos foram sacrificados e necropsiados em 27-5-929 (94 dias). O 1º. apresentava varios *granulos brancos* nas alças do mesenterio e debaixo do figado, entre os lobos quadrado e de SPIEGEL, e um pequeno abcesso nesse orgão. O exame microscopico dos granulos e orgãos deu resultado positivo identico ao descripto tantas vezes acima. O 2º. camondongo tinha alguns *nodulos*, 1 delles adherente e ligando 2 lobos do figado, este orgão e o baço congestos e augmentados. Os esfregaços do figado são ricos em *massas bacillares* de enorme grandeza. O 3º e ultimo apresentava apenas *raros* bacillos no figado.

A nova serie de inoculações consta de 35 animaes injectados em 28 do expirante com emulsão de lepromas de varios doentes do Leprosario de Curupaity, Jacarépaguá, gentilmente obtidos por intermedio do Dr. THEOPHILO DE ALMEIDA.

Como se vê as experiencias continuam com maior escala.

*Resumo.* Dos 33 camondongos inoculados 3 não foram examinados por terem morrido muito cedo ou em dias feriados; 2 foram negativos e 28 positivos, isto é, apresentavam bacillos acido-alcool-resistentes num orgão qualquer.

Dos 28 positivos 17 apresentavam nodulos, 5, tumores e 4, microabcessos. Alguns tinham tumores e microabcessos, outros nodulos e tumores. Facto significante é a coincidencia de resultados em lotes de animaes inoculados com material de doentes varios (ao todo 9) de differentes procedencias.

*Passagens.* As inoculações de camondongos com emulsões de orgãos bacilliferos e de nodulos e ganglios, retirados de camondongos infectados teem sido negativas. Devo informar, entretanto, que essas passagens foram poucas (11 animaes) por economia do material, ora reservado para o musêo, sempre gasto em córtes, esfregaços e tentativas de culturas.

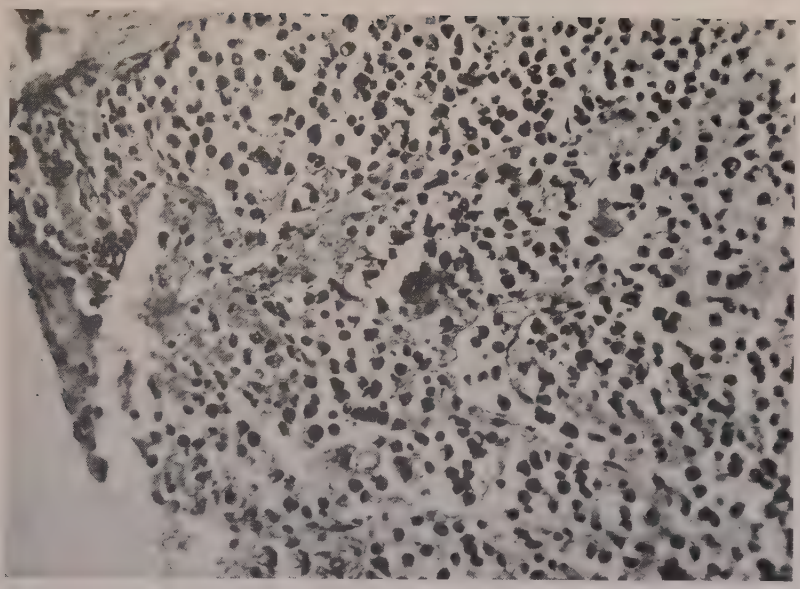


Photo J. Pinto

Photomicrographia N. 1. *Camondongo*. Lote 3.

Córte do tumor lymphoide encontrado adherente ao baço e á musculatura lombar. Corado pela hematoxylina-eosina.

Os esfregaços e córtes deste tumor, corados pelo ZIEHL-NEELSEN, revelaram grande riqueza de bacillos acido-alcool-resistentes.

Nota : Camondongo inoculado em 6-6-928 com 1/2 cc. de emulsão de lepromas de ANDRADE. Via intraperitoneal . Sacrificado em 29-6-928 (23 dias).

Photomicrograph N. 1. *Mouse*. Lot. 3.

A cut of the lymphoid tumor found sticking to the spleen and the lumbar musculature. Stained by hematoxylin-eosin.

The rubbings and sections of this tumor, stained by ZIEHL-NEELSEN, revealed a great richess of acid-alcohol-fast bacilli.

N. B.—Mouse inoculated on 6. 6. 1928 with 1/2 cc. of an emulsion of lepromas of ANDRADE. Via intraperitoneal. Killed on the 29 6. 1928 (23 days).

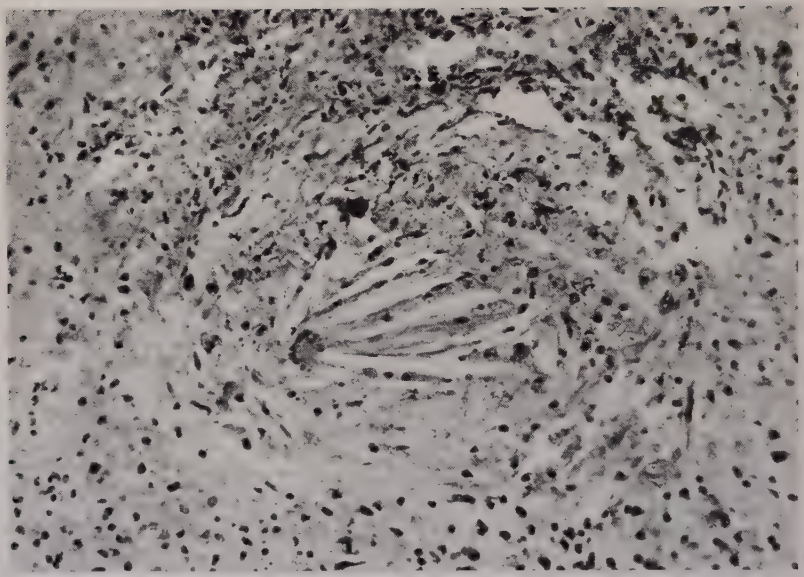


Photo J. Pinto

Photomicrographia N. 2. *Camondongo*. Lote 5.

Córte de tumor do pancreas, corado pela hematoxylina-eosina, mostrando um aspecto lymphoide e espaços deixados pelos crystaes de cholesterina. Este camondongo apresentava 8 nodulos adherentes ao epiploon e ao mesenterio. Os esfregaços das visceras, dos nodulos e ganglios, esfregaços e córtes do tumor, corados pelo ZIEHL-NEELSEN, revelaram grande abundancia de bacillos acido-alcool-resistentes. Córtes seriados desse tumor, reproduzidos em desenho, mostram o abarrotamento do tecido pelos bacillos.

Nota : Camondongo inoculado em 5-7-928 com 1/2 cc. de emulsão de lepromas de HILDA, por via intraperitoneal. Morto em 24-11-928 (após 145 dias).

Photomicrograph N. 2. *Mouse*. Lot 5.

A section of a pancreatic tumor, stained by hematoxylin-eosin, showing a lymphoid aspect, and the spaces left by crystals of cholesterin. This mouse showed 8 nodules sticking to the epiploon and the mesentery. Rubbings of viscera, of the nodules and the ganglia, stained by ZIEHL-NEELSEN, revealed abundant acid-alcohol-fast bacilli. Seriated cuts of this same tumor, represented in drawing, show the over whelming of the tissue with bacilli.

N. B.—Mouse, inoculated 5. 7. 1928 with 1/2 cc. of the HILDA's emulsion of lepromas, intraperitoneally. Died on 24. 11. 1928 (after 145 days).

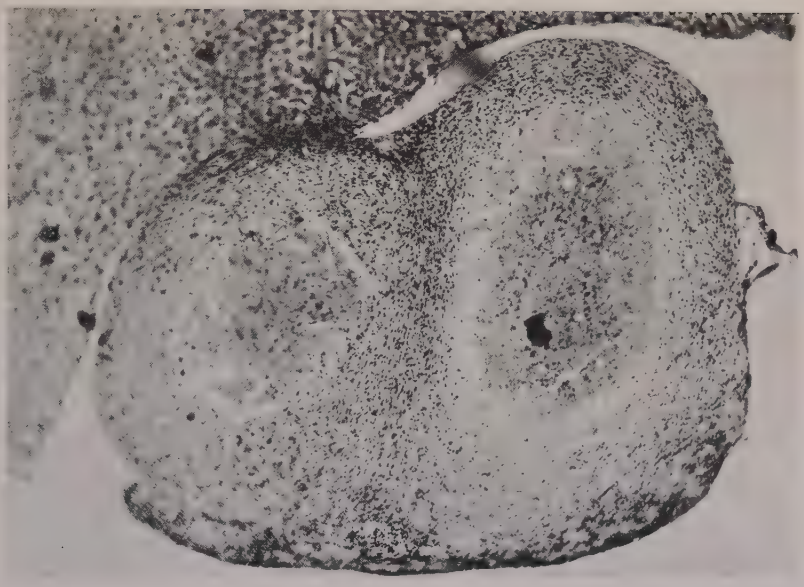


Photo J. Pinto

Photomicrographia N. 3. *Camondongo.* Lote 4.

Córte de tumor encontrado adherente ao lobo direito do figado, apresentando fócos de necrose com espaços deixados pelos crystaes de cholesterina. Corado pela hematoxylina-eosina. O mesmo orgão apresentava 3 granulomas (V. photo 4), sendo 2 superficiaes e 1 interno, no lobo esquerdo. Os esfregaços e córtes desse tumor e do figado, corados pelo ZIEHL-NEELSEN, revelaram grande abundancia de bacillos acido-alcool-resistentes, isolados, em feixes e em globias.

Este animal apresentava mais 2 nodulos adherentes ao epiploon.

Nota : Camondongo inoculado em 27-6-928 com 1/2 cc. de emulsão fresca de lepromas de ANDRADE, por via intraperitoneal. Sacrificado em 5-12-928. (Após 154 dias).

Photomicrograph N. 3. *Mouse.* Lot 4.

A cut of a tumor found sticking to the right lobe of liver, showing foci of necrosis with spaces left by crystals of cholesterin. Stained by hematoxylin-eosin. The same organ showed 3 granulomata (S. phot. 4), being 2 superficial and 1 internal, in the left lobe. The rubbings and cuts of this tumor and of the liver, stained by ZIEHL-NEELSEN, revealed to a big extent acid-alcohol-fast bacilli, isolated, in bundles and in "globies".

The same animal bore also 2 nodules sticking to the epiploon.

N. B.—Mouse inoculated on 27. 6. 1928 with 1/2 cc. of a fresh ANDRADE's emulsion of lepromas, intraperitoneally. Killed on 5. 12. 1928 (after 154 days).

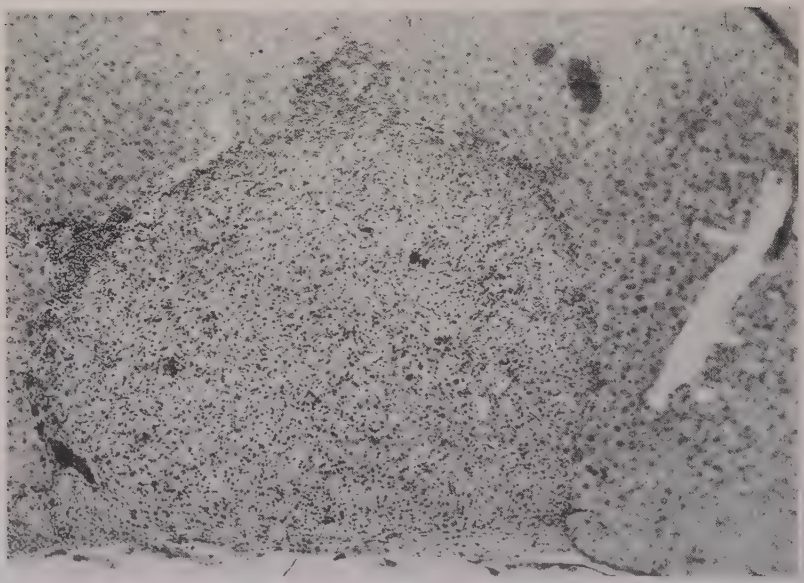


Photo J. Pinto

Photomicrographia N. 4. *Camondongo*. Lote 4.

O mesmo animal da photographia N. 3.

Granuloma lepromatoso do figado, de origem peripherica. Tudo como na photomicrographia N. 3.

Photomicrograph N. 4. *Mouse*. Lot 4.

The same animal as in photogr. N. 3.

A lepromatous granulom in the liver, of peripheric origin. All else as in photomicrograph N. 3.

Photo J. Pinto

Photomicrographia N. 5. *Camondongo*. Lote 17.

Córte de tumor encontrado junto ao figado (parte interessando esta glandula) e adherente á musculatura da parede anterior do abdomen, como se vê pelas fibras musculares do córte. Os esfregaços do tumor, dos ganglios inguinaes e mesentericos, do rim, do figado e do pulmão deste animal, são tambem ricos em bacillos acido-alcool-resistentes, em feixes e em globias.

Nota: Camondongo inoculado, por via intraperitoneal, em 22. 2. 929, com emulsão de lepromas 5 doentes do Hospital S. Sebastião. Morto em 10-3-929.

Photomicrograph N. 5. *Mouse*. Lot. 17.

A section of the tumor found close to the liver (the part that interests this organ) and sticking to the musculature of the anterior wall of the abdomen, as is seen by the muscular fibres in the cut. The rubings of the tumor, of the hip ganglia, mesenteric ganglia, of the kidney, liver and lung of this animal, show also abundance of acid-alcohol-fast baclili, in bundles and in "globies".

N. B. - Mouse, inoculated intraperitoneally, on 22. 2. 1929 with an emulsion of the lepromas from 5 patients of the St. Sebastian Hospital. Died 10. 3. 1929.

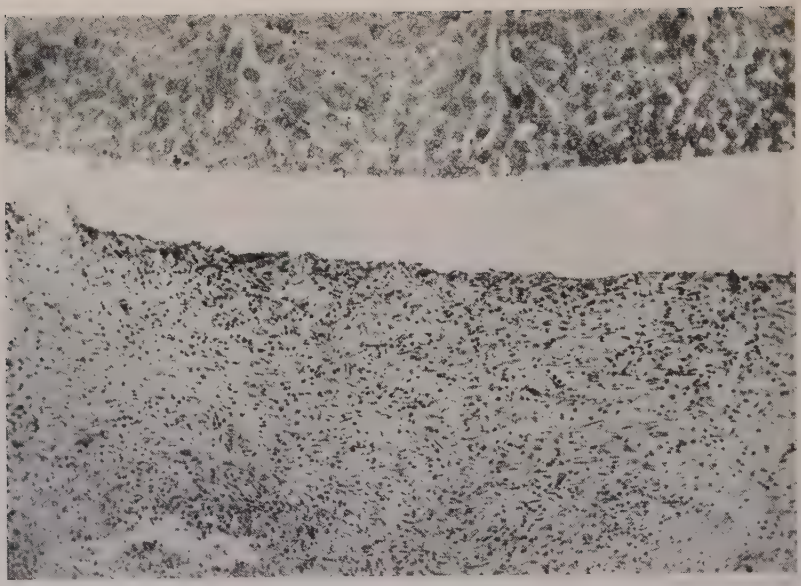


Photo J. Pinto

Photomicrographia N. 6. *Camondongo*. Lote 17.

O mesmo animal da photomicrographia N. 5.

Photomicrographia mostrando a predominancia de fibroblastos no tumor de recente formação. Apresenta dous fócos de necrose. Tumor riquissimo em bacillos acido-alcool-resistentes.

Nota: Veja a da figura N. 5.

Photomicrograph N. 6. *Mouse*. Lot 17.

The same animal as in photomicrograph N. 5.

This photomicrograph shows the prevalency of fibroblasts in the recently formed tumor. Two foci of necrosis are observed. This tumor was very rich in acid alcohol-fast bacilli.

N. B.—Refer to the note at foot of fig. N. 5.

*Os nodulos.* Duas classes de nodulos ou granulos tenho observado: uns brancos, muito resistentes, verdadeiras massas bacillares, semelhantes aos grãos de mycetoma, de tamanho variavel, ora soltos, ora adherentes ás visceras abdominaes; outros, acinzentados, mais molles e ás vezes friaveis, adherentes ao mesenterio ou ao epiploon, contendo menos bacillos e algumas cellulas ou detrictos: devem ser ganglios mesentericos ou epiploicos muito hypertrophiados.

Nos camondongos normaes esses ganglios não são facilmente visiveis a olho nú. Os granulomas do figado me parecem ser de origem peripherica, pela proliferação de um daquelles nodulos que adherem fortemente á sua capsula. Não se nota cirrhose do figado, nem degeneração das cellulas hepaticas, nos casos estudados.

*Tumores.* Pequenas neoformações tenho encontrado adherentes ao baço, ao pancreas, ao figado e á musculatura abdominal. Primeiramente parecem ser fibroblastomas, depois tumores lymphoides, sempre ricos em bacillos acido-alcool-resistentes, intra e extracellulares. Mais tarde apparecem outros typos de cellulas em redór dos fócos de necrose de caseificação, tendo no centro espaços deixados pelos crystaes de cholesterina.

Segundo o Dr. MAGARINOS TORRES a extructura de um desses tumores, (o do pancreas) o unico que elle examinou, não apresentava: "*o aspecto histologico de folliculos tuberculosos typicos*".

Cholesterina foi verificada em tumores do figado e do pancreas.

Sabemos que este alcool monatomico provem, na sua maior parte, da secreção interna das capsulas supra-renaes e é eliminada pela bile; que a sua acção defensiva contra as intoxicações externas e infecções é poderosa; e que ella existe em excesso no sangue de leprosos activos.

Como explicar a sua presença nos tumores dos camondongos das nossas experiencias?

Só a continuação desses estudos poderá esclarecer o caso.

Trouxe á Academia *factos*, que reputo de certa importancia.

As conclusões ficam para o futuro.

Manguinhos, 31 de Maio de 1929.

# Studies upon Leprosy

## III. Transmission of Human Leprosy to white Mouse (*)

(2nd Note with 6 figures)

By H. C. de SOUZA-ARAUJO, M. D., Dr. P. H.

I shall have the honor to read before this Academy my second note upon experimental leprosy. It is a summary of the results of inoculations in 33 white mice with virulent leprotic material. In a further note, I shall deal with the results of inoculation of mice with avirulent leprotic stuff, as also with inoculation of other laboratory animals, less sensible to the infection.

*Technique.* The lepromas, extirpated without any skin, are triturated in a sterilized mortar, with sand and saline solution. The emulsion thus obtained is then diluted in the same solution up to a convenient concentration, which is verified by means of the microscope, filtrated afterwards on cotton, and inoculated as quickly as possible. Intraperitoneal injection was the preferred way, the dose for each mouse being half a cubic centimetre, this inoculation being allowed to be repeated after two or three weeks.

*Results.* The three mice referred to in my previous note (2. VIII. 1928) belonged to the lots 3, 4 and 5.

*Lote 4* consisted of 9 mice, inoculated on the 3. VII. 1928, with ANDRADE's material. The No. 2 of the first note, having been withdrawn, there remained 8 mice, of which 4 were inoculated again, on the 26. VII. 1928 with the same dose and the same material of the same patient.

The sort of the four primitive mice was the following: one died on the 9. VIII. (after 37 days inoculation), showing *micro-abscesses in the lungs*, rich in acid-alcohol-fast bacilli, and *caseated mesenteric ganglia*, with but few bacilli. Smears of the liver, kidneys and spleen remained negative.

Another died on the 21. VIII. (49 days) showing hardly some scarce bacilli in kidney and a "globie" in the peritoneal fluid.

The 3rd, killed in the agonic period, on the 26. VII. (53 days) showed *white nodules* sand-stone-like or similar to granulations of mycetoma, sticking to the mesentery, to the epiploon and the abdominal viscera, being squash-proof and formed with masses of acid-alcohol-fast bacilli, and very scarce cellular detritus.

The fourth, killed and necropsied on the 15. XII. (165) showed *three micro-abscesses* in the liver, identical to those of the third mouse

(*) Read before the National Academy of Medicine, Rio de Janeiro, on the 31st May 1929.

stated in my previous note, *two white nodules* equal to those described above, between the pancreas and the spleen and a third one sticking to the epiploon.

Smears of those nodules revealed *masses of acid-alcohol-fast bacilli.* Rubbings of liver, kidney and lung remained negative.

The presence of these nodules appeared to me of such high interest, that I wished my colleagues of the Oswaldo Cruz Institute to see them *in loco*, and upon my invitation to do so, Dr. CHAGAS, Dr. GODOY, Dr. FARIA, Dr. FONSECA and others came to my laboratory. Since then, Dr. LUTZ began to show interest for my experiments, and I greatly availed myself of his valuable advices.

Of the 4 re-inoculated mice, one died 114 days later (25. X.) without showing either lesions or bacilli.

Another, which died on the 5. XII. (154 days), though not showing any macroscopic lesion, revealed in great abundance, bacilli in bundles and "globies" in rubbings of viscera.

The third, killed on the same day (5. XII) showed *minim nodules* in the liver, between the square lobe and the SPIEGELII, *one bigger nodule* (small tumor) sticking to the right lobe (See microphotographs 2 and 3) and others of various sizes sticking to the mesenteric folds and to the epiploon. Sections of the same liver revealed granulomae of peripheric origin.

Sections of the tumor show necrotic foci with spaces left by crystals of cholesterin.

One of the biggest nodules of the liver, being cut and squashed on a glass platen, appeared like a cystic swelling full with bacillary masses, a kind of *giant "globies"* which were never to be seen, either in human or experimental material.

The 4th, killed and necropsied on the 15. XII. (164 days) aslo showed such *granules* in the liver, just below the square lobe. Smears of abdominal viscera of the last two animals, colored by ZIEHL-NEELSEN, on a first rather quick examination, did not reveal acid-alcohol-fast bacilli.

These encouraging results demonstrate the convenience of re-inoculations, a matter which has been much discussed about at the 3rd International Conference of Leprosy (Rapport, 1924, p. 117).

*Lot 5* consists of 6 mice, inoculated on the 5. VII. 1928, with HILDA's material, one of which named as N. 3 in my previous note. The 2nd, which died on the 12. VIII. (38 days) and the 3rd on the 19. IX. (76 days), showed acid-alcohol-fast bacilli in rubbings of the main abdominal organs, as also, with regard to the second, in the mesenteric lymph-nodes.

The 4th, killed when in agony and necropsied on the 9. X. (97 days) showed a *slight tumor* between the liver and the pancreas, and *micro-abscesses* in the spleen. Rubbings of this tumor, of the liver, of the spleen and of the lung were rich in acid-alcohol-fast bacilli.

The fifth, died on the 24. XI. (172 days) showed a *small tumor in the pancreas* (See microphotograph n. 4) and *8 minim nodules* adhering to the mesenteric folds and to the epiploon.

The inoculation of these nodules on butter-agar resulted negative.

The 6th, killed and necropsied on the 23rd of January 1929 (after 202 days from the inoculation) showed some *necrosed* spots in the liver, *with nodules* adhering to the liver capsule, and other scattered about in the abdominal cavity. These nodules were taken off, triturated in a mortar and the emulsion injected into two mice. The result was negative.

The tumor of the pancreas above referred to was examined and described by Dr. MAGARINOS TORRES, who judged it most interesting, owing to the presence of spaces left by crystals of cholesterin. Dr. AMADEU FIALHO who was also applied to in this respect, is of the opinion that this discovery is a real histopathologic curiosity.

The 6 mice of the *lote* 7, were inoculated on the 26. VII. 1928 with ANDRADE's material. One of them died on the first month and was not examined; another died on the 15. XI. (112 days) showing *one nodule* in the liver, with big masses of acid-alcohol-fast bacilli, and, in the spleen, zones of necrosis with but few bacilli.

The other four were killed and necropsied on the 15. XI. (142 days) appearing as in normal condition. In 3 of them, there were *nodules* absolutely alike to those already described.

All the rubbings of abdominal viscera proved negative.

The *3 mice* of *lot 13*, were inoculated on the 23. X. 1928 with material of F. LOPES. As the emulsion was of a weak concentration, I increased the dosis to 1 c.c. for intraperitoneal injection and gave more 1/4 of a c.c. subcutaneously.

With the purpose of a demonstration to Dr. BORZONE, the Director of the Bacteriological Institute, Santa Fé, Argentine Republic, I killed these three animals on the 24th of January 1929 (92 days after inoculation).

The first autopsy allowed us to see *innumerable granules* scattered about and sticking to the mesentery, to the epiploon and to the liver.

The latter gland showed generalized *micro-abscesses.*

The rubbings of the granules, of the liver and the spleen, revealed a huge quantity of acid-alcohol-fast bacilli in bundles, in typical "globies" and in masses. Dr. BORZONE took the whole material of this mouse with himself for studying purpose, on his way back to Argentine.

The second we autopsied showed: a few *nodules*, one *tumor* sticking to the spleen and to the abdominal wall, one abscess in the left lobe of the liver and *innumerable small nodules* just below this organ, adherent to the fan-shaped fold of peritoneum and other scattered in the intestine, etc.

Both rubbings and cuts of this tumor proved to be rich in bacilli of leprosy.

The third and last one allowed us to observe also *granules*, in smaller quantity, scattered in the abdominal space. The rubbings of the granules, of the spleen and the liver were positive.

The 6 mice of *lot 14* were inoculated, on the 27. XI. 1928, with 1 c.c. of the material of A. PARIS. Two of them died on the first and 4th December, and were not examined. Two other, died on the 6. XII. (9 days after inoculation) one of them showing a few acid-alcohol-fast bacilli in the spleen, the other in the spleen, kdney, testicle and peritoneal fluid. No

nodule or ganglia were to be observed with bare eye. The 5th, died on the 10. XII. (13 days) and showed *one mesenteric ganglion* rather increase d. Viscera examined macroscopically appeared as normal. Rubbings of ganglia, spleen, kidneys and liver were rich in acid-alcohol-fast bacilli, which was probably a product of absorption (?). No nodules were observed.

The 6th and last, killed on the 25. I. 1929 (59 days) showed rare *parasite granules* and *one mesenteric ganglion* very enlarged, with a few acid-alcohol-fast bacilli.

*Lot 17* comprised 5 mice, inoculated on the 22. II. 1929 with a new and filtrated emulsion of lepromas which I had extirpated from 5 patients at the St. Sebastian Hospital. The dosis was 1/2 c.c.

The first of these died on the 10. III. 1929 (16 days) showing a small *tumor* close to the liver and sticking to the musculature of the front wall of the abdomen (see microphotographs 5 and 6), liver discolored, one mesenteric ganglion and another groin ganglion were enlarged.

Sections of the tumor proved to be rich in acid-alcohol-fast bacilli, intra and extra-cellular. Rubbings of the liver, kdney, lung and of a inguinal ganglion were positive, those of the spleen proving negative.

The 2nd was killed and on the 15. V. (52 days) when it showed a large crusted ulceration in the hips. We observed in the viscera bacilli and also *abdominal nodules.*

The last three mice were killed and necropsied on the 27th May 1929 (94 days). I saw in the first one various *white granules* in the folds of the mesentery and under the liver between the square lobe and the lobe of SPIEGEL, also a small abscess in the liver. The microscopical examination of the granules and organs gave a positive result, equal to that described repeatedly here above. The second mouse had a few *nodules*, one of which sticking to and binding two lobes of the liver, this organ as also the spleen being congested and increased. The rubbings of the liver were rich in *bacillar masses* of gigantic size. The last third showed hardly *few* bacilli in the liver.

The new series of inoculatinos consisted of 35 animals, injected on the 28th of May with an emulsion of lepromas from a number of patients of the leprosarium at Curupaity, Jacarépaguá, which were kindly handed to me by Dr. THEOPHILO DE ALMEIDA.

As is patent, our experiments are being carried on on a larger scale.

*Summary.* Of the 33 inoculated mice, 3 were not examined, on account of having died too early or during holidays; 2 remained negative and 28 positive, that is, showed acid-alcohol-fast bacilli in either organ.

Of the 28 positive, 17 had nodules, 5 had tumors, and 4 had micro-abscesses. Some ones had tumors with micro-abscesses, others nodules with tumors. A noteworthy fact is the coincidence between the results of lots of animals which were inoculated with material from various patients (in the whole 9) and coming from different states.

*Passages.* The inoculations of mice with emulsions of bacilliferous organs and of nodules and lymphe-nodes, extracted from infected mice

have remained negative. I must state, in fact, these passages were but very few (11 animals) owing to scarcity of material, which was either reserved for the museum, or and always for cuts, rubbings and attempts of cultures.

*The nodules.* I observed nodules or granules of two classes: some ones white, highly resistent, real bacillary masses, with some resemblance with grains of mycetoma, of varied size, either loose, or sticking to the abdominal viscera; others, ash grey, softer, sometimes friable, adhering to the mesentery or the epiploon, containing less bacilli and a few cells or detritus: these should be mesenteric or epiploic ganglia very hypertrophied.

In normal mice, such ganglia are not likely to be seen with bare eye. The granulomas of the liver seem to me as of peripheric origin, in view of the proliferation of one of these nodules which are strongly sticking to the liver capsule. No cirrhosis of the liver nor degeneration of hepatic cells has been found in the cases I studied.

*Tumors.* Small neo-formations have been found sticking to the spleen the pancreas, the liver and the abdominal walls. At first, it seems these would be fibroblastomae, afterwards, lymphoid tumors, always rich in acid-alcohol-fast intra and extra-cellular bacilli. Later on, other types of cells appear all around the foci of caseating necrosis, with in their centre, spaces left by crystals of cholesterin.

According to Dr. MAGARINOS TORRES, the structure of one of these tumors, one of the pancreas, the only one he examined, did not show "*the histologic aspect of typical tuberculous follicles*".

Cholesterol was verified in tumors of the liver and the pancreas.

We know this monoatomic alcohol is provenient mostly from the internal secretion of bile the adrenals, being eliminated by the bile; also that its defensive action against external intoxications and infections is a powerful one; and that it exists in excess in the bood of active lepers.

What then may account for the presence of this stuff in the tumors of mice in our experiments?

Only further studies will enable us to throw some light hereon.

Bringing this before the Academy, I confined myself in exposing *concrete facts*, which I deem of a certain importance.

Future only may enable to draw conclusions.

Manguinhos, 31st of May 1929.

# Studies upon Leprosy

## I. Transmission of Human Leprosy to the white Mouse (*) (Preliminary note, with 7 figures).

By H. C. de SOUZA-ARAUJO, M. D., Dr. P. H.

*(Reprinted)*

On perusing again literature about experimental transmission of human leprosy and murine leprosy to laboratory animals, I verified the frequent mistaking the "Hansenian infection" and "provokind leprosy", which are far from being synonymous, for, in my opinion, nobody has still obtained the transmission of "human leprosy" to white mouse.

### LITERATURE

In 1902, T. SUGAI (1) inoculated human leper material to Japanese dancing mice, and obtained, in about 20 of them, an infection followed by lepromatous infiltration of the viscera, containing numerous bacilli. The author reports that, the death of the animals took place between the 19th and the 104th day of the inoculation, but does not describe cutaneous lesions.

CHARLES W. DUVAL (2) succeeded likewise in infecting this variety of mouse, either with his culture of the bacillus of leprosy, or with leproma emulsion. The incubation stage lasted from 4 to 6 weeks; DUVAL states he reproduced "the disease in the Japanese dancing mouse", which animal he considers as a test material. Nor does he describe any cutaneous lesion. As to the white mouse, white and grey rats, etc., his renewed attempts to infect such remained unsuccessful.

W. J. KEDROWSKY (3) made use of his culture known as "bacillus of leprosy" after a passage through Guinea pig, and succeeded in infecting three white mice. KEDROWSKY affirmed reservedly, before the Third International Conference of Leprosy (1923), basing himself on this preliminary attempt of 1903 or 1904, which remained pending, owing to the Russo-Japanese War, he had been successful in inoculating leprosy to rabbits and mice (J'ai réussi à inoculer la lèpre aux lapins et aux souris, Page, 32, Rapport). In this author's opinion, the best infection way for rats and mice is the ocular mucosa.

MARCHOUX and SOREL (4) verified that the white mouse *can be* infected with murine leprosy, without generalization of the bacilli, as observed in rats.

With material from the corpse of a man who had died from murine leprosy, showing granulous bacilli in the viscera, MARCHOUX obtained

(*) Paper read before the National Academy of Medicine, Rio de Janeiro, August 2, 1928. The original was published in Portuguese in this supplement, Nº. 1, of August 1928.

the infection of 5 out 6 white rats he had inoculated. MARCHOUX proved therefore that granulous bacilli are not "cadavers" as some leprologists would pretend, and that murine leprosy can, occasionally attack man. Anyhow, he did never succeed in transmitting human leprosy to rats or mice.

Struck with this fact, MARCHOUX (6) undertook in 1925, numerous researches, inoculating white rats and Guinea pigs with fresh material of human leprpsy, with a view to make certain the bacilli of leprosy are and the same in both diseases. He did not come, nevertheless, to any result.

K. HARADA (7) using his own culture of the bacillus of leprosy, told me he had obtained the infection in rats, the result being : death after the 30th day. I have no idea, what kind of rats he used for his experiments.

MUIR, HANDERSON and LANDEMAN (8) obtained experimental infection in 97.7 o/o of the white rats and decumanus inoculated with *Bacillus leprae murium,* with formation of abdominal tumors, meanwhile MUIR and HANDERSON (9) came to negative results in inoculating material ef human leprosy to Japanese dancing mice, white rats and Chinese hamster (*Cricetulus griseus*).

ANGELO H. ROFFO (10) had no better success with 100 rats he inoculated in 1927 with leproma emulsions, from various patients, rich in bacilli.

This summary of the literature on the subject is necessary for a better appreciation of some points of my own experiments.

## MY EXPERIMENTS

With an emulsion of a leproma scratched out from the back of the hand of Dr. J. P. A. (of Minas Geraes) (see figs 1 and 2) rich in bacilli, I inoculated on the 6th of June of 1928 :

1) One monkey *Pseudo-cebus* with
   1 c.c. in the malar region, subcutaneously, and
   1 c.c. intraperitoneally ;
2) One white rat with
   1 c.c. intraperitoneally ;
3) Three white mice each of them with
   1/2 c.c. intraperitoneally.

*Results after 23 days, say, on the 29th of June 1928*:

a) The monkey shows a nodule in the face. The same monkey had undergone a former inoculation with leproma from another patient, on the 3rd February, in the face and peritoneum. On the 18th of March, he showed two small nodules on his forehead, these having disappeared after one month. The first infection was patent after 45, the second after 23 days.

b) The white rat does not show abnormality whatever.

c) Of the two mice, one died on the day next to the inoculation. The other showed on the 23rd a fistula between the lower right ribs. The liquid gathered herefrom with a platinum rod, after disinfection of the spot, was very rich in acid-fast bacilli and globoid masses (see fig. 3). The animal

who grew rather ill, was then killed, and I found an *abdominal tumor*, one centimetre long, half as wide, sticking on the spleen, affecting the peritoneum and the lumbar musculature. Smears of this tumor, of the abdominal ganglia, of the spleen and liver, showed many acid-alcohol-fast bacilli, most of which in fasciae, also in the form of globoid masses. Macroscopically, the liver appeared normal, though being the most infected organ. Sections of this tumor—of lymphoid constitution—of the spleen and kidneys, which I am indebted for to the kindness of Dr. BURLE DE FIGUEIREDO, revealed to my examination, in larger extent the former two, abundance of acid-fast bacilli in fasciae, of normal appearance.

*Here is a case of generalized "Hansenian infection".*

*The presence of globoid masses (zoogleic masses, the "globies" of* MARCHOUX, *specific of human leprosy) in the liver, spleen and ganglia, proves the multiplication of the bacillus in situ, according to* WADE's *affirmation, and this is not a case of murine leprosy.*

With an emulsion of viscera of this animal, I inoculated three mice one Guinea pig and one white rat. Two of the former died accidentally, the other one is well, the same as the Guinea pig.

The rat showed, 18 days afterwards, an abdominal subcutaneous nodule which grew up to the size of an olive. On the 24th day, I decided to extirpate this tubercule for culture purposes and found it caseified. Smearings of the pus and of the abdominal scratches showed some acid-alcohol-fast bacilli, pigmented, with the appearance of real degeneration, as also a big globoid mass, with granulous bacilli.

*
* *

On the 3rd of July, I extracted, without skin, two more lepromas from the same patient Dr. J. P. A. After preparing the emulsion of same, which was rich in bacilli, I repeated the culture in various media, and inoculated 9 white mice and one Guinea pig intraperitoneally. Half 1/2 was injected to the mice, and one 1 c.c. to the Guinea pig. On the 17th of same month, one of the mice showed a dermic nodule on its back and another in the right scapula, both of the size of a pea; also a smaller one on the abdomen. There was a complete alopecia on both former elements. (See Photo n. 6).

On the 20th, these nodules showing tendency to diminish, I then decided to extirpate the dorsal one for culture purposes, but found it caseified. A summary examination of the pus did not prove this to be bacillipherous. Being the animal killed, I found the liver and spleen hardly congested and increased in size. Smears from the liver, spleen and kidneys showed some acid-alcohol-fast bacilli, scattered into groups of 2 to 4, segmented or granulous, proving an advanced degeneration.

*The production of dermic nodules, similar to lepromas, accompanied with complete alopecia in loco, induces me to consider the case one of transmission of human leprosy to the white mouse.*

***

On the 5th of July, I extracted two blooming lepromas from Miss H. S. (of Minas Geraes). With the emulsion of one of them, I inoculated, intraperitoneally, 6 white mice. Dose for each of them: half c.c. I left the other leproma to stay in pure alcohol, for 36 hours, after which I triturated it and passed it into an emulsion, inoculating then three other mice (witnesses), with the same dose and in the same way as the former. The emulsion of leproma treated by alcohol was also rich in bacilli, of a morphological appearance equal to that of fresh material. On the 27th in the morning, one of the first 6 mice happened to have died. Necropsy revealed: liver and lungs covered with micro-abscesses (aspect of granulia); the other viscera with normal appearance. (See fig. 7). Smearings from lungs, liver, spleen, abdominal ganglia, kidneys and testicle showed acid-alcohol-fast bacilli, single and in fasciae. The kidneys showed masses of bacilli. Smears from the micro-abscesses showed apparent heaps of acid-alcohol-fast bacilli with microscopic fields of 3 to 5 "globies" (see fig. 4).

I decided to keep the piece intact for the Museum of the Institute.

Examining again to-day all the other inoculated animals—about 30 in all—I found no case of apparent illness.

## CONCLUSIONS

1) The inoculation of emulsion of lepromata to white mouse, intraperitoneally, produces either a mere generalized infection, causing death within 3 or 4 weeks, or an infection characterized by a tumor, micro-abscesses or dermic nodules.

2) The presence of "globies" in the tumor, micro-abscesses and nodules in the viscerae, proves a real multiplication of Hansen's bacillus in the animal.

3) The transmission of the infection from the white mouse to the white rat was positive.

4) The verification of the infectableness of the white mouse through Hansen's disease, has opened a wide field of experimentation for the study of the etiopathogeny of leprosy.

Manguinhos, 31st of July 1928

## BIBLIOGRAPHY

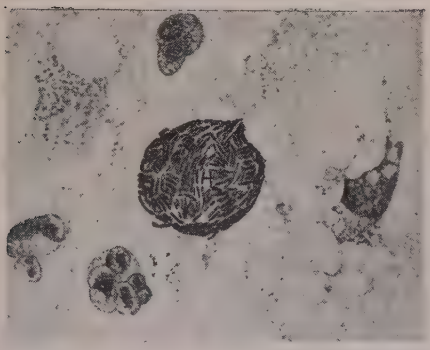
1) Sugai, T.,—Gelungen Uebertragungsversuche mit lepra bei Säugetieren. LEPRA, Vol. 8, Fasc. 3, P. 157, 1909.

2) Duval, Charles W.,—The cultivation of leprosy bacillus and the experimental production of leprosy in the Japanese dancing mouse.
Jour. Experim. med. Vol. 12, p. 649, New York 1910.

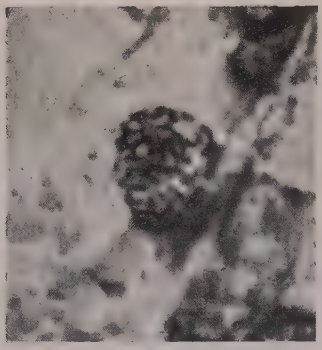
3) Kedrowsky, W. J.,—Experimentalle Untersuchungen ueber Lepra-impfungen bei Tieren. Zeitsch. f. Hygiene und Infektkrank., Vol. 66, pp. 1–97, 1910, e p. 32 IIIe Conf. Intern. de la lèpre (1923) Rapport. Paris 1924.

1

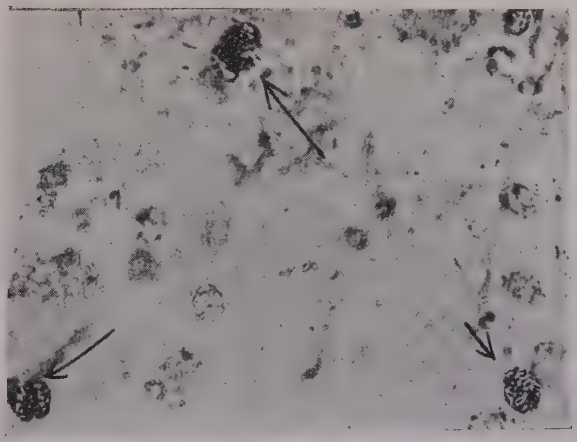
2



3



4



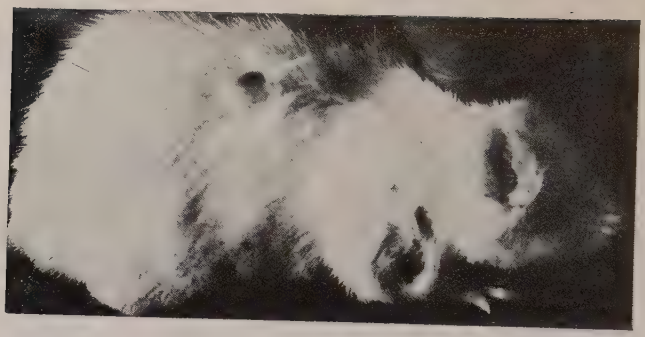
5 Phots J. Pinto

Fig. 1—J. P. A., a leper since 26 years, who provided material for infecting a monkey, white mice, and a white rat (the latter by passage).

Fig. 2—Design of smearings of the inoculated leproma emulsion. (Immersion 1/12 and ocular 15).

Fig. 3—A "globie". Design of the smearings of the secretion of the fistula in the first infected mouse. Largely magnified.

Fig. 5—Globoid masses. Microphotograph of smearings of micro-abscesse of the third infected mouse.



6

7

Phots J. Pinto

Fig. 6—Second mouse infected with material from the patient J. P. A. Nodules on the back, right scapula and abdomen. Acid-alcohol-fast bacilli in the viscera.

Fig. 7—Third mouse infected with human leprosy. The micro-abscesses of the lungs and liver were rich in globoid masses.

4) Marchoux et Sorel. – Lepra, tomo XIII, p. 171, 1913. La lèpre des rats.
5) Marchoux, E., – La lèpre du rat et sa transmission probable a l'Homme. IIIe. Conférence Internationale de la lèpre. Rapport, p. 109, Paris, 1924.
6) Marchoux, E. Unicité ou pluralité des bacilles lépreux. Bull. Acad. Med. Vol. 94, N. 39, p. 1091, 1925.
7) Harada, K., *in* Cultura do bacillo da lepra (H. C. de Souza-Araujo). Brazil Medico, de 5 de Março de 1927.
8) Muir, Herderson and Landeman.,—Tumor-like growths caused by intraperitoneal inoculation of *B. leprae murium*. Ind. Jour. med. Res., Vol. XV, p. 15, 1927.
9) Muir, E. and Henderson, J. M., – Rat Leprosy etc. Indian jour. med. Res. V. XV, N. 3, p. 807, 1928.
10) Roffo, A. H., – Sobre la transmission de la lepra a los monos inferiores. Bol. Inst. Medicina Experim., N. 15, Jan. 1927. B. Aires.

# Nova contribuição para o conhecimento do cyclo evolutivo das Holostomideas ou Strigeidas.

Communicação preliminar do Dr. ADOLPHO LUTZ.

Em 1921 fiz no Centralblatt fuer Bakteriologie etc., Parte I, Vol. 86, p. 124, uma communicação preliminar em que mostrei que o genero *Holostomum* ou *Strigea* tinha cercarias de cauda bifida que não se enkystavam logo ao penetrar em um segundo hospedador, porém viviam base tante tempo livres nos tecidos em fórmas que chamei de precysticas, porquacabavam formando *Tetracotyles* enkystados, depois de passar por uma phase opaca e mostrando pouca estructura. Uma dellas, que se parecia muito com a conhecida *Tetracotyle typica*, transformava-se no intestino de patinhos em *Strigea* pequena, parecida com a *S. cornuta* RUD., confirmando uma observação de ERCOLANI. A grande *Tetracotyle* das sanguesugas transformou-se, em pintinhos, numa pequena *Strigea*, parecida com uma observada espontaneamente em *Gallinula galeata* e num pequeno socó. A gyrinipeta foi acompanhada até um certo ponto de evolução, faltando os ultimos estados, o que se explica por observações posteriores.

Contra a minha espectativa, a minha nova orientação, embora bastante revolucionaria, não encontrou contradictores sendo hoje geralmente acceita.

Continuando as minhas observações, encontrei, nos primeiros annos, mais de vinte especies de cercarias de cauda bifida que, com poucas excepções, deviam pertencer a holostomideos. Algumas destas se distinguiam facilmente, outras, do typo de *C. gracilis* LA VALETTE, tinham a estructura tão pouco differenciada que eram mais caracterisadas pelos dous primeiros hospedadores ou pela difficuldade de encontrar o segundo hospedador. Por isso pesquizei tambem, nas mesmas regiões, *holostomidas* adultos e *Tetracotyles* que serviam para experiencias de infecção.

Em molluscos de agua doce, as *tetracotyles* eram frequentes, mas apparentemente eram todas da mesma especie já mencionada. Nas sanguesugas encontrei uma segunda especie, microcystica, reconhecida apenas pelo exame microscopico. Não obstante um material abundante, não consegui determinar o hospedador definitivo. Os gyrinos se deixavam infectar por varias especies que não chegaram á formação de *tetracotyles*. O mesmo se deu com peixinhos, embora mostrassem alguma attracção. Cobras não se infectavam pela pelle nem pela bocca. Com injecção rectal de uma *dicranocercaria*, que não procurava os outros animaes experimentados, obtive apenas um principio de infecção parenchymatosa. Quanto á mammiferos e aves nenhuma das cercarias experimentadas procurava penetrar por sua pelle.

Entretanto, observava *tetracotyles* legitimas em tamboatás (*Callichthys*), raras vezes em rãs, mas frequentemente em cobras aquaticas, varias vezes em

passaros aquaticos e tres vezes em mammiferos carnivoros: duas em raposas (*Canis Azarae*) e uma em *Grison vittatus*, erroneamente conhecido pelo nome vulgar *furão*. Todas estas especies, menos a das rãs, foram usadas para experiencias em urubús, gaviões e corujas, não se notando differenças nos resultados, obtidos sempre com facilidade. Com trinta-reis (*Sterna*) obtive num urubú grande numero de *Strigeas* adultas, a que dei o nome provisorio de *Strigea ornithocystis*, talvez identica com *Strigea falconis var. brasiliana* SZIDAT. As outras especies, que designei como *ichthyocystis*, *ophiocystis* e *theriocystis*, todas correspondem ao typo de *Holostomum vaginatum* BRANDES, que provavelmente comprehende mais de uma especie. *Ichthyocystis* é a menor; das outras talvez *theriocystis* seja um pouco maior, podendo alcançar quasi um centimetro, em preparação de balsamo, com o cone genital completamente sahido. As experiencias repetidas excluem qualquer confusão e a procedencia deve separar as trez especies, não obstante a sua grande semelhança. A *Strigea*, encontrada por SZIDAT entre as especies colleccionadas por NATTERER e tendo como hospedador *Dicholophus cristatus*, deve ser a minha *Strigea ophiocystys*, porque a Seriema é grande comedora de cobras.

No correr das minhas experiencias encontrei varias vezes distomulos livres na musculatura de gyrinos e batrachios, que lembravam as observações semelhantes de GASTALDI na Italia, e, em menor grau, os distomulos descobertos por DUNKER na carne de porco. Na zona do instituto, o material era escasso e foi encontrado em *L. ocellatus*. Achei a mesma especie em *Hyla rubra* do Estado de S. Paulo. Outra especie com as glandulas salivares ao lado e em frente do acetabulo que lembrava o *Agamodistomum marcianae*, foi observada em muitos exemplares de *Leptodactylus pentadactylus* da Bahia. Estes trematodes achavam-se livres, principalmente no tecido interfibrillar dos musculos, e mostravam grande vitalidade.

A organisação destes pequenos trematodes, posto que rudimentar, é muito clara, ao contrario do que se dá com as dicranocercarias correspondentes, em que os detalhes são difficilmente percebidos. Sem o conhecimento de certas experiencias, seriam naturalmente classificados como verdadeiros distomulos, o que se fez até agora, mas as experiencias indicaram que se tratava da phase de evolução de um trematodeo como já reconheceram CORT e BROOKS. Todavia a carne infectada era dada a varios animaes sem que se obtivesse algum holostomideo intestinal.

Em Julho de 1928 estive em Natal, onde achei a *Hyla crepitans* muito abundante. Os adultos tinham na carne muitos agamodistomos do typo observado no Rio, que só podiam provir de uma pequena Dicranocercaria de *Planorbis anatinus*, tambem já observada. Do dia 12 em diante alimentou-se um pombinho com carne destas *Hylas* adultas e com gyrinos infectados da mesma especie. No dia 18 o pombinho, examinado, não mostrou nada no intestino, porém, nos tecidos em redor do figado e do esophago, achou-se todo o cyclo evolutivo desde a fórma intramuscular das rãs até á outras opacas e granulosas que, precedem a formação de *Tetracotyles* parecidas com *T. typica*. A fórma enkystada não foi encontrada ainda, mas teria certamente apparecido um ou dous dias depois. Encetei immediatamente nova experiencia com um patinho que foi examinado depois de 12 dias e outro

que foi conservado vivo para ser levado para o Rio por mar, emquanto eu voltava de aeroplano.

No primeiro patinho encontrámos grande numero de *Tetracotyles*, bem visiveis porque estavam dentro de kystos bastante grandes, apparentemente formados pelo hospedador. Eram localisadas principalmente no pescoço e no tecido subcutaneo. Na falta de uma ave appropriada, os tecidos infectados foram dados para um gatinho que devia ter seguido para o Rio, mas que se extraviou antes do embarque. O patinho, embora bem recommendado, foi roubado a bordo. Recomecei as experiencias no Rio com alguns dos batrachios de Natal, dados a dous patinhos; infelizmente ratos selvagens mataram-nos antes do tempo necessario para a formação dos *Tetracotyles*.

Estes accidentes não prohibem considerar o cyclo fechado, visto já ter obtido não sómente a *Strigea ornithocystis* adulta como tambem a infecção de rãs com dicranocercarias por via experimental.

O facto de haver Trematodeos que vivem em *quatro* hospedadores differentes parece completamente novo. É tambem muito interessante que um dos hospedadores intermediarios possa pertencer á mesma classe ou a uma classe mais elevada que o hospedador definitivo.

Segundo CORT e BROOKS os agamodistomos das rãs engulidas por cobras passam para os tecidos destes. Assim talvez fosse facil verificar-se até cinco hospedadores.

Em occasião opportuna espero completar estas experiencias e fazer uma exposição mais detalhada e accompanhada de gravuras sobre os meus estudos a respeito os holostomideos.

Rio de Janeiro, 14 de Junho de 1929.

# Inhalt der vorstehenden vorlaeufigen Mitteilung:

## Neuer Beitrag zur Kenntnis des Entwicklungszyclus der Holostomiden oder Strigeiden.

Von Dr. ADOLPHO LUTZ.

Anknuepfend an seine erste Mitteilung im "Centralblatt fuer Bacteriologie", Bd. 86, 1921, erwaehnt Verf. verschiedene Holostomidencercarien, mit denen Infektionsyersuche angestellt wurden. Die erzielten *Tetrakotylen* wurden in Voegeln zu *Strigeaarten* erzogen. *Tetrakotylen* wurden auch direkt beobachtet und zwar in einem Suesswasserfisch *(ichthyocystis)*, in Batrachiern (*batrachocystis*), in Schlangen (*ophiocystis)*, Wasservoegeln (*ornithocystis*) und in Raubtieren (*Canis Azarae* und *Grison vittatus*). Letztere erhielt den vorlaeufigen Namen *theriocystis*. Mit Ausnahme der zweiten, spaerlich gefundenen Art wurden saemmtliche in *Falconiden*, *Vulturiden* und *Strigeiden* erzogen. Diese erwiesen sich als gleichwertige Wirte; doch wurde *Catharista atrata* am meisten benutzt. *Ornithocystis* erwies sich als der *Strigea falconis var. brasiliensis* SZIDAT aehnlich oder gleich; die drei uebrigen entsprachen alle dem Typus von *H. vaginatum* BRANDES, doch war *ichthyocystis* kleiner und *theriocystis* wohl etwas groesser. Die von NATTERER in *Dicholophus cristatus*, einem bekannten Schlangenfresser, gefundene und von SZIDAT angefuehrte, zu *S. vaginata* gerechnete Art duerfte wohl der *ophiocystis* entsprechen.

Ausser Tetrakotylen und erwachsenen *Strigea*formen wurden auch wenigstens zwei *Agamodistomum*arten in der Musculatur von Batrachiern beobachtet und mit Gabelschwanzcercarien in Verbindung gebracht. Sie incystirten sich nicht und die experimentelle Verfuetterung ergab keine Dermparasiten; dagegen erzielte ein in Natal mit Material von *Hyla crepitans* gemachter Versuch an einer ganz jungen Taube, der sechs Tage dauerte, alle Uebergaenge zu der opaken Trematodenform, welche der Bildung typischer *Tetrakotylen* vorausgeht. Ein zweiter Versuch mit einem Entchen ergab nach 12 Tagen zahlreiche, sehr deutliche *Tetrakotylen*, die in blaeschenaehnlichen Cysten eingeschlossen, besonders in der Naeche des Oesophagus und im subcutanen Zellgewebe lagen. Die Verfuetterung derselben misslang wegen Verlusts der Versuchstiere und neues Material konnte bisher nicht beschafft werden. Doch kann der Entwicklungszyklus durch die frueheren Versuche mit *ornithocystis* als geschlossen betrachtet werden. Die zu dieser Art gehoerige Dicranocercaria ist sehr klein und wurde sowohl in Natal, als in Rio, in *Planorbis anatinus* D'ORBIGNY gefunden.

Damit duerfte die hoechst merkwuerdige Tatsache erwiesen sein, dass es Trematoden gibt, deren Entwicklung sich auf *vier* Wirte verteilt. Zu diesen duerfte auch *ophiocystis* und *theoriocystis* gehoeren. Von den verschiedenen Gabelschwanzcercarien, die nach meinen Beobachtungen in Kaulquappen eindringen, scheint nur eine *Tetrakotylen* in Batrachiern zu bilden, waehrend es andre wohl erst in einem spaeteren Wirte tun.